Untersuchungen über das circadiane System von Fliegen

Bedeutung der optischen Ganglien für die Laufaktivitätsrhythmik von Musca domestica und die Laufaktivitäts- und Schlüpfrhythmik von Drosophila melanogaster

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Charlotte Helfrich
aus Heilbronn-Sontheim

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0003

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS CIRCADIANE SYSTEM VON FLIEGEN

BEDEUTUNG DER OPTISCHEN GANGLIEN FÜR DIE LAUFAKTIVITÄTSRHYTHMIK VON MUSCA DOMESTICA UND DIE LAUFAKTIVITÄTS- UND SCHLÜPFRHYTHMIK VON DROSOPHILA MELANOGASTER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von
Charlotte Helfrich
aus Heilbronn - Sontheim

1985

Tag der mündlichen Prüfung	18.07.1985
Dekan	Prof. Dr. H. U. Seitz
1. Berichterstatter	Prof. Dr. W. Engelmann
2. Berichterstatter	Prof. Dr. E. Bünning

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Engelmann danke ich für die Betreuung der Arbeit. Ganz besonders dankbar bin ich ihm dafür, daß er rund um die Uhr Zeit für mich hatte und mich unterstützte, wo immer er konnte, mir aber andererseits ein selbständiges Arbeiten und die Verwirklichung meiner eigenen Ideen ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. B. Cymborowski möchte ich für die praktische Hilfe beim Operieren von Stubenfliegen danken. Des weiteren für wertvolle Diskussionen und für die Ermöglichung eines Studienaufenthaltes in Warschau.

Frau Dr. M. Muszyńska-Pytel und Frau G. Zielińska danke ich für ihre Hilfe beim Färben von neurosekretorischen Zellen.

Frau C. Wigand bin ich für praktische Tips bei der histologischen Bearbeitung der Fliegen dankbar und dem M.P.I. Tübingen für die Bereitstellung von Stubenfliegen.

Herrn Dr. K.F. Fischbach danke ich für das zur Verfügungstellen der Drosophila-Mutanten und für Informationen über sie.

Herrn Prof. Dr. E. Bünning und Frau Dr. P. Reinhard möchte ich Dank sagen für das kritische Durchlesen und Korrekturlesen des Manuskriptes.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Kameradschaft und für viele kleine Hilfeleistungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

DD	:	Dauerdunkel
RR	:	Dauerrotlicht
LL	:	Dauerlicht
LD	:	Licht-Dunkel-Wechsel
T⇅	:	Temperaturwechsel
α	:	Aktivitätszeit
$\bar{\alpha}$	:	mittlere Aktivitätszeit
ϱ	:	Ruhezeit
$\alpha : \varrho$	:	Verhältnis von Aktivitäts- zu Ruhezeit
Ψ	:	Phasenwinkel
$\Delta\Psi$	:	Phasenwinkeldifferenz
$\overline{\Delta\Psi}$	:	mittlere Phasenwinkeldifferenz
τ	:	Periodenlänge
$\bar{\tau}$	:	mittlere Periodenlänge
T	:	Periodenlänge des Zeitgebers
CT	:	circadiane Zeit
L-an	:	Licht-an
L-aus	:	Licht-aus
LP	:	Lichtpuls
OP	:	Operation
S.OP	:	Scheinoperation
α'	:	Vertrauenswahrscheinlichkeit
D.	:	DROSOPHILA
M.	:	MUSCA

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. VERSUCHE MIT MUTANTEN VON DROSOPHILA MELANOGASTER 5

B.1. Material und Methoden 5

B.1.1. Versuchstiere 5
B.1.2. Versuchsaufbau und Registrierung 7
B.1.2.1. Laufaktivitätsversuche 7
B.1.2.2. Schlüpfrhythmik 11
B.1.3. Versuchsdurchführung 13
B.1.3.1. Laufaktivitätsrhythmik 13
B.1.3.2. Schlüpfrhythmik 14
B.1.4. Auswertung 14
B.1.4.1. Laufaktivitätsrhythmik 14
B.1.4.2. Schlüpfrhythmik 16
B.1.5. Statistik 16
B.1.6. Färbung der neurosekretorischen Zellen 16
B.1.6.1. Präparation und Fixierung der Gehirne 17
B.1.6.2. Färbung und Einbettung der Gehirne 17
B.1.6.3. Auswertung der Präparate 17

B.2. Ergebnisse 19

B.2.1. Laufaktivität 19
B.2.1.1. Freilaufversuche 19
B.2.1.2. Synchronisation von **sol;so** und **per^0** durch einen Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12:12) 31
B.2.1.3. Synchronisation von Wildtyp-Fliegen und **sol;so**-Mutanten durch Temperaturzyklen (12:12) 42
B.2.2. Schlüpfrhythmik 46
B.2.3. Neurosekretorische Zellen 50
B.2.3.1. Allgemeine Beobachtungen 50
B.2.3.2. Beschreibung der gefundenen neurosekretorischen Zellgruppen beim Wildtyp 51
B.2.3.3. Neurosekretorische Zellgruppen bei den Mutanten 51

B.3. Diskussion 56

B.3.1. Bedeutung der optischen Ganglien für die Laufaktivitätsrhythmik von DROSOPHILA MELANOGASTER 56
B.3.2. Mögliche Erklärung der Arrhythmie bei **per^0** 58
B.3.3. Verhalten der blinden Fliegen im LD und Vergleich mit dem Wildtyp 59
B.3.4. Schlüpfrhythmik 63
B.3.5. Neurosekretorische Zellen 64

Seite

C.VERSUCHE MIT MUSCA DOMESTICA 67

C.1. Material und Methoden 67

C.1.1. Versuchstiere 67
C.1.2. Versuchsaufbau, Registrierung und Auswertung 67
C.1.3. Versuchsbedingungen 67
C.1.4. Operative Methoden 68
C.1.4.1. Durchtrennung der optischen Trakte und Lobektomie 68
C.1.4.2. Abdecken von Komplexaugen und Ocellen mit schwarzem Wachs 70
C.1.5. Histologische Kontrolle 70

C.2. Ergebnisse 71

C.2.1. Charakteristika der Laufaktivitätsrhythmik von MUSCA DOMESTICA 71
C.2.1.1. Verhalten im RR und DD 71
C.2.1.2. Verhalten im LL 76
C.2.1.3. Verhalten im LD 81
C.2.1.4. Verhalten in Temperaturzyklen 86
C.2.2. Laufaktivität von operierten Fliegen im RR 89
C.2.2.1. Auswirkung der Operation auf die Laufaktivitätsrhythmik 89
C.2.2.2. Histologische Untersuchung 92
C.2.2.3. Korrelation zwischen postoperativem Verhalten und histologischem Befund 96
C.2.2.4. Charakteristika der postoperativen Rhythmen 98
C.2.3. Laufaktivität von operierten Fliegen im LD 102
C.2.4. Verhalten im LD nach Abdecken von Komplexaugen, Ocellen oder beidem 107

C.3. Diskussion 110

C.3.1. Charakteristika der Laufaktivitätsrhythmik von MUSCA DOMESTICA 110
C.3.1.1. Verhalten im RR 110
C.3.1.2. Verhalten im DD und LL 112
C.3.1.3. Verhalten im LD und in Temperaturzyklen 114
C.3.2. Laufaktivität von operierten Fliegen 115
C.3.2.1. Bedeutung der optischen Ganglien für die Laufaktivitätsrhythmik von MUSCA DOMESTICA 115
C.3.2.2. Fotorezeption und Synchronisation bei blinden Fliegen 120

D. VERSUCHE MIT CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA 123

D.1. Material und Methoden 123

D.2. Ergebnisse 123

Seite

D.3. Diskussion 126

E. ALLGEMEINE DISKUSSION 127

E.1. Lokalisation des Laufaktivitätsoszillators 127

E.2. Möglischer Aufbau des Oszillatorsystems 130

E.3. Extraoculare Fotorezeptoren bei MUSCA und DROSOPHILA 132

F. ZUSAMMENFASSUNG 135

G. ANHANG 138

G.1. Zuchtmedium für DROSOPHILA 138

G.2. Nähere Angaben zur histologischen Technik 138
G.2.1. Physiologische Kochsalzlösungen 138
G.2.2. Fixative 139
G.2.3. Farbstoffe 139
G.2.4. Schritte von Fixierung bis Einbettung 140

H. LITERATUR 141

A. EINLEITUNG

Tagesperiodisch ablaufende Prozesse werden bei den meisten Lebewesen durch "innere Uhren" gesteuert . Nach der Entdeckung dieses Phänomens wuchs das Interesse daran, die anatomische Lage dieser inneren Uhren zu ergründen.
Wenn auch jede Einzelzelle potentiell zu circadianen Schwingungen befähigt sein muß - Einzeller können sogar mehrere Rhythmen zeigen (Hastings, 1959) -, so scheinen bei Metazoen doch spezielle Zellen in Zentren eine übergeordnete Rolle im circadianen System übernommen zu haben.
Nervenableitungen, Läsionen, Entfernung von Teilen des Nervensystems und Transplantationen haben bei Insekten geholfen, das Protocerebrum des Gehirns und die optischen Ganglien als bedeutsam für die Ausprägung von Rhythmen zu erkennen. Die genaue Lage der rhythmischen Zentren (Pacemaker) innerhalb dieser Teile des Gehirns ist jedoch Gegenstand heftigen Disputs.

Bei einigen Insektenarten konnten Pacemaker in den optischen Ganglien nachgewiesen werden:

Pacemaker für die Laufaktivitätsrhythmik sitzen bei PERIPLANETA AMERICANA, LEUCOPHAEA MADERAE und BLABERUS FUSCUS in den optischen Ganglien (Nishiitsutsuji-Uwo und Pittendrigh, 1968 a,b; Roberts, 1974; Sokolove, 1975; Page et al., 1977; Page, 1978; 1982 a; Lukat und Weber, 1979).
Pacemaker für die Singrhythmik wurden bei TELEOGRYLLUS COMMODUS in den optischen Ganglien lokalisiert (Loher, 1972; Sokolove und Loher, 1975; Wiedenmann, 1985). Bei GRYLLUS BIMACULATUS sind die optischen Ganglien für die Ausprägung der Laufaktivitätsrhythmik (Tomioka und Chiba, 1984) und der ERG-Rhythmik (Tomioka und Chiba, 1982) unentbehrlich.
Weiterhin sind die optischen Ganglien für die ERG-Rhythmik und die Laufaktivitätsrhythmik von verschiedenen Käferarten von entscheidender Bedeutung (Fleissner, 1982; Koehler und Fleissner, 1978; Balkenohl und Weber, 1981).

Bei anderen Insekten wurde dem Zentralgehirn eine größere Bedeutung als rhythmisches Zentrum beigemessen als den optischen Ganglien:
Bei ACHAETA DOMESTICA wurden Pacemaker für die Laufaktivitätsrhythmik im Protocerebrum um die Pars intercerebralis herum vermutet (Azaryan und Tyshchenko, 1970; Tyshchenko, 1973) und in den neurosekretorischen Zellen der Pars intercerebralis (Cymborowski, 1973; 1981; 1983).
Die rhythmische Flugaktivität von ANTHERAEA PERNYI und HYALOPHORA CECROPIA verschwindet nach Entfernen der Cerebralloben, aber nicht nach Entfernen der optischen Ganglien (Truman, 1974).

Bei CULEX PIPIENS bleibt sie ebenfalls nach Entfernen der optischen Ganglien erhalten (Chiba und Kasai, 1984).

Die Mutante so von DROSOPHILA MELANOGASTER zeigt noch rhythmische Aktivität, obwohl die optischen Ganglien auf 20 % verkleinert sind (Helfrich und Engelmann, 1983). Transplantationsversuche von Gehirnen von D. MELANOGASTER (Handler und Konopka, 1979) waren erfolgreich im Induzieren einer in der Mutante per^0 fehlenden Rhythmik, obwohl darauf geachtet wurde, möglichst wenig Gewebe der optischen Ganglien mitzutransplantieren (Konopka, persönliche Mitteilung). Unabhängig von der Lage des Pacemakers setzt die erfolgreiche Induktion der Rhythmik die Beteiligung von humoralen Wegen voraus. Als Hinweis dafür fanden Konopka und Wells (1980) abnormal gelegene neurosekretorische Zellen bei der arrhythmischen Mutante per^0.

Betrachtet man alle Ergebnisse zusammenfassend, so kristallisieren sich zwei grundlegend verschiedene Vorstellungen heraus:

1) Die optischen Ganglien enthalten wichtige circadiane Pacemaker. Die Information von diesen Pacemakern wird auf neuralem Wege weitergeleitet.

2) Das Zentralgehirn ist der Sitz von übergeordneten Oszillatoren, wobei neurosekretorische Zellen maßgeblich beteiligt sind. Zumindest bei der Informationsvermittlung spielen Hormone eine Rolle.

Ziel meiner Arbeit war, die Bedeutung der optischen Ganglien für das circadiane System von Dipteren (DROSOPHILA MELANOGASTER und MUSCA DOMESTICA) noch genauer zu ergründen, da in den bisherigen Untersuchungen ihre Beteiligung nicht sicher ausgeschlossen werden konnte.

Anlaß dieser Untersuchungen war die Möglichkeit, auf bereits existierende Gehirnmutanten von D. MELANOGASTER zurückgreifen zu können. Diese Mutanten weisen Reduktionen in verschiedenen Bereichen der optischen Ganglien auf. Die stärksten Reduktionen haben die Doppelmutanten **small optic lobes;sine oculis** und **minibrain;sine oculis**, deren optische Ganglien auf < 5 % verkleinert sind.

Die Mutanten bieten den Vorteil, den Einfluß von Reduktionen im optischen Bereich auf die Rhythmik zu messen, ohne daß Eingriffe am Tier mit möglicherweise verfälschenden Nebenwirkungen nötig sind. Als Nachteil muß angeführt werden, daß einerseits noch geringe Reste der optischen Ganglien vorhanden sind, andererseits aber auch nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß bestimmte Neurone im Zentralgehirn fehlen. Zumindest **small optic lobes** und **minibrain** - und damit auch die Doppelmutanten - haben ein leicht verkleinertes Zentralgehirn (Heidenreich, 1982). Weiterhin könnte man einwenden, daß die Mutanten sozusagen sekundär ein neues, verändertes circadianes System benutzten könnten.

Aus diesem Grund wurden die Nachteile von operativen Eingriffen in Kauf genommen und zusätzlich die Auswirkungen der Durchtrennung beider optischer Trakte und teilweiser Lobektomie auf die Rhythmik von MUSCA DOMESTICA untersucht.

Auf das Problem einer möglichen Beteiligung des neurosekretorischen Systems bei der Steuerung der Laufaktivitätsrhythmik konnte nur am Rande eingegangen werden. Da möglicherweise die Lage oder das Fehlen von lateralen neurosekretorischen Zellen eine Rolle spielt (Konopka und Wells, 1980), wurden diese bei den DROSOPHILA - Doppelmutanten untersucht. Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang, ob eine kleine laterale neurosekretorische Zellgruppe (Köpf, 1957) zwischen optischen Ganglien und Zentralgehirn von der Mutation betroffen war.

Bei den Mutanten wurde Schlüpf- und Laufaktivitätsrhythmik gemes sen und mit dem Wildtyp und der arrhythmischen Mutante per^0 (Ko nopka und Benzer, 1971) verglichen. Bei MUSCA DOMESTICA wurde di Laufaktivitätsrhythmik vor und nach dem operativen Eingriff unter sucht.

Nach Messung der Rhythmik von Mutanten und operierten Fliegen i Freilauf wurden Synchronisationsversuche mit LD-Wechsel bzw. Tem peraturzyklen durchgeführt, um Näheres über synchronisierend Faktoren und eventuelle extraoculare Fotorezeptoren bei blinde Fliegen zu erfahren.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem zugrundelie genden Kontrollmechanismus der circadianen Laufaktivitätsrhythmi bei Fliegen. Es wird auf die mögliche Steuerung der Rhythmik durc zwei Oszillatorpopulationen eingegangen und versucht, diese nähe zu charakterisieren. Dabei werden auch an CALLIPHORA ERYTHROCE PHALA gemachte Aktivitätsuntersuchungen miteinbezogen.

B. VERSUCHE MIT MUTANTEN VON D. MELANOGASTER

B.1. Material und Methoden

B.1.1. Versuchstiere

Die Laufaktivität und die Schlüpfrhythmik wurde gemessen bei den D. MELANOGASTER-Mutanten:

optomotor blind	omb	(Labor K. Fischbach; Universität Würzburg)
lobulaplateless	lop	"
minibrain	mnb	"
small optic lobes	sol	"
sine oculis	so	"
minibrain;sine oculis	mnb;so	"
small optic lobes; sine oculis	sol;so	"
aperiodische Mutante	per^0	(Labor W. Zehring; Brandeis University, Massachusetts)
Mutante mit kurzer Periodenlänge	per^s	"

und dem Wildtyp:

Wildstamm Berlin	WT_B	(Labor K.G. Götz; MPI Tübingen)

Alle Stämme wurden im LD 12:12 (20°C ± 3°C) auf einem seit Jahren bewährten Nährmedium in Massenhaltung gezüchtet (Rezept siehe Anhang). Für die Versuche wurden Tiere beiderlei Geschlechts verwendet, da in Vorversuchen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Rhythmik gefunden wurden.

Phänotyp der Mutanten

omb : Mutationsort: Inversion auf dem X-Chromosom mit Bruchstellen bei 4C4-7 und 12D2-E1;

Äusserlich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die Riesenneuronen der Lobulaplatte fehlen oder sind stark reduziert (Heisenberg et. al, 1978).

lop : Mutationsort: 2 -

Äusserlich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die senkrechten Kleinfeldelemente der Lobulaplatte fehlen (Fischbach und Heisenberg, 1981).

mnb : Mutationsort: X-Chr. 58,5 (± 0,8).

Äusserlich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Gesamtgehirn ist auf 52 % verkleinert (Heidenreich, 1982).

sol : Mutationsort: X-Chr. 67,5 (± 2).

Äußerlich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Medulla und Lobulakomplex sind um 50% reduziert, das Zentralgehirn um 12 % (Fischbach und Heisenberg, 1981; Heidenreich, 1982).

so : Mutationsort: 2 - 57,1 (Milani, 1951).

Die Ocellen fehlen immer, die Komplexaugen sind in unterschiedlichem Ausmaß reduziert. Bei vollständiger Ausprägung der Mutation sind die Tiere völlig augenlos. Die optischen Ganglien sind auf 20 % reduziert. Die Lamina fehlt ganz (Fischbach, 1983; Abb. 1b).

mnb;so und sol;so : Doppelmutanten mit linearer Addition beider Mutationen. Aussehen wie so. Für die Versuche wurden nur augenlose Tiere verwendet.
Die optischen Ganglien sind auf <5 % reduziert und miteinander verschmolzen, so daß die einzelnen Ganglien nicht mehr unterscheidbar sind (Abb. 1c.)

per^0 : Mutationsort: X-Chr. 381-2, zwischen zeste und white. Aussehen normal.

Aktivität und Schlüpfen sind arrhythmisch (Konopka und Benzer, 1981).

B.1.2. Versuchsaufbau und Registrierung

B.1.2.1. Laufaktivitätsversuche

Die Laufaktivität wurde mittels Infrarot - Lichtschranken registriert. Die Unterbrechung des Lichtstrahls durch ein Tier erzeugte einen Impuls, der über einen Verstärker zu einem Ereignisschreiber (Esterline Angus) geleitet wurde und dort eine Feder auslenkte (Abb. 2).
Später wurde das System umgestellt: Die Impulse wurden über einen Multiplexer und Microprocessor (AIM 65) auf eine PDP 11/40 übertragen. Gleichzeitig wurden die Daten mit Hilfe eines Microcomputers (Orion) direkt auf einer Diskette gespeichert.
Die Abfrage der Daten durch den Microprocessor erfolgte stündlich. Dabei waren die Daten digital so verschlüsselt, daß der Stundenwert in 15 4-Minuten-Intervalle unterteilt war. Passierte die Fliege innerhalb eines 4-Minuten-Intervalls ein oder mehrmals die Lichtschranke, wurde dies als "aktiv" gewertet, bei keinem Durchgang als "inaktiv". Ein Stunden-Intervall bestand also aus 15 "Ja - Nein - Entscheidungen".

Die Fliegen wurden in kleinen Plexiglasschälchen (Durchmesser: 35 mm, Höhe: 11 mm) gehalten, durch die an einer Stelle die Lichtschranke ging. Als Nahrung diente den Fliegen Zucker und destilliertes Wasser. Die Wasserversorgung wurde durch Dochte gewährleistet, die von einem Wasserfläschchen in die Versuchsschälchen ragten.

Insgesamt standen 30 solcher Meßstellen zur Verfügung, gegen Ende der Versuche wurden sie auf 55 erweitert.

a
b
c

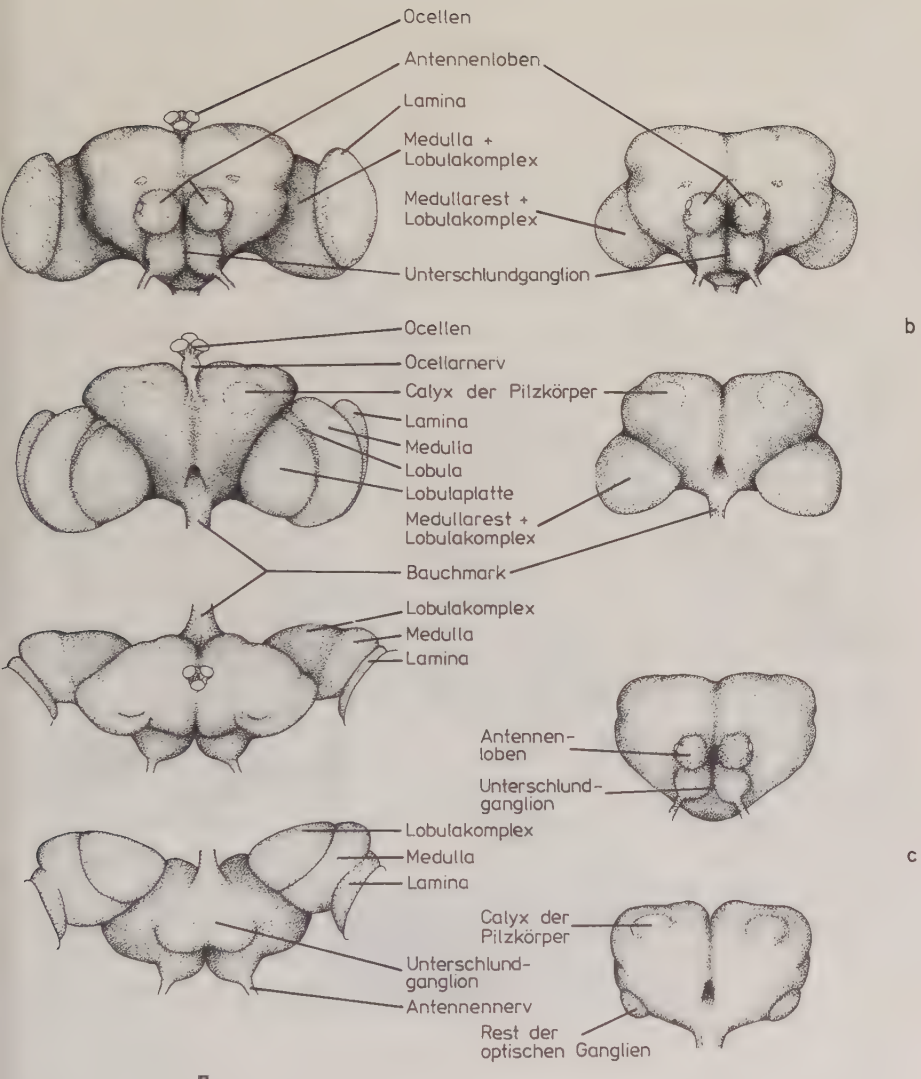


Abb. 1: Vergleich des Wildtypgehirns (a) mit dem der Mutanten **so** (b) und **sol;so** (bzw. **mnb;so**) (c).

Linke Seite: Fotografien von freipräparierten Gehirnen; beim Wildtyp sind auf der rechten Hälfte noch Reste von Ommatidien zu erkennen.

Rechte Seite: Zeichnungen nach den freipräparierten Gehirnen zur Verdeutlichung der Unterschiede in den optischen Ganglien.
a) Wildtypgehirn von vorne, hinten, oben und unten; b), c) Gehirn von **so** und von **sol;so** jeweils von vorne und hinten.

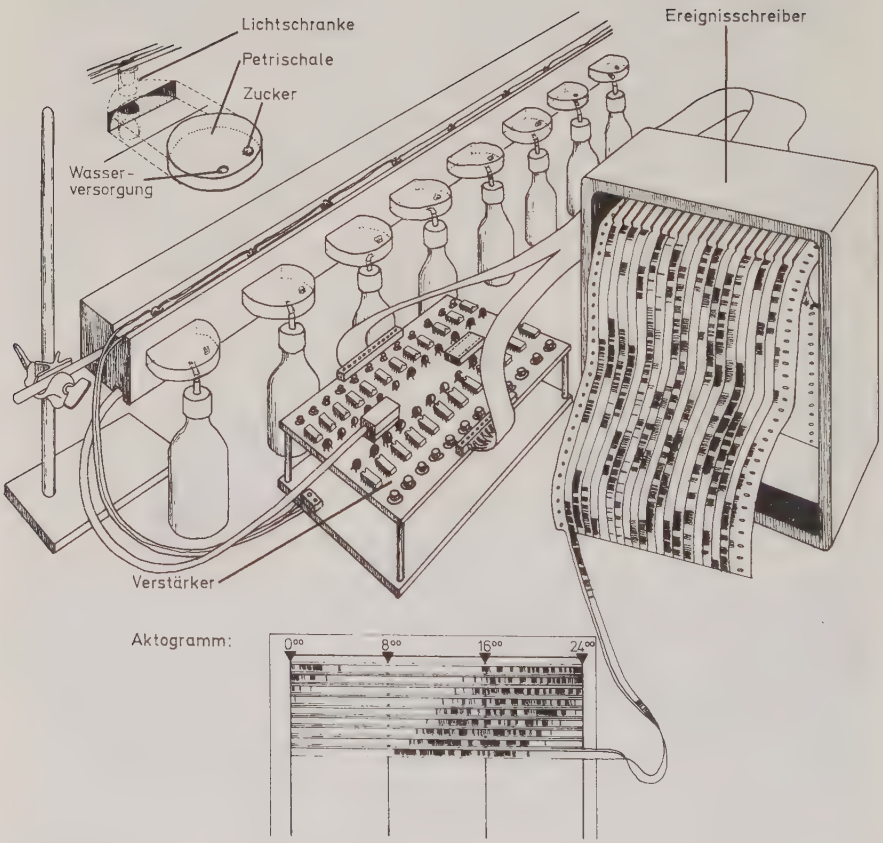


Abb. 2: Registrierung der Laufaktivität von Fliegen. Anhand der Aufzeichnungen einer Fliege auf dem Ereignisschreiber ist die Entstehung eines Aktogramms gezeigt; (verändert nach: Engelmann und Klemke, 1983).

8.1.2.2. Schlüpfrhythmik

Die Aufzeichnung der Schlüpfrhythmik erfolgte mittels der gleichen Registrieranlage wie die der Laufaktivität: Die Meßstellen wurden lediglich um 90° gekippt, so daß die Lichtschranken auf Bewegungen in der Senkrechten ansprachen (Abb. 3).

Die Puppen der Fliegen wurden mit "Glutofix" auf eine Glasplatte (110 mm x 110 mm) geklebt und diese umgekehrt auf einen Trichter (105 mm Durchmesser) gelegt. Der Trichter war innen mit Teflon (Hostaflon TF 5032, Hoechst) überzogen, um ein Festhalten der Fliegen am Glas zu vermeiden. Die frisch geschlüpften Fliegen fielen durch den Trichter durch die Lichtschranke hindurch in mit Wasser gefüllte Gefäße. Die Oberflächenspannung des Wassers wurde mit Spülmittel verringert, so daß die Fliegen ertranken.

Jede geschlüpfte Fliege wurde auf diese Weise auf dem Ereignis-Schreiber als Strich markiert.
15 verschiedene "Schlüpfpopulationen" konnten gleichzeitig registriert werden.

Bei so und den Doppelmutanten wurde auf die automatische Registrierung verzichtet, da eine Unterteilung in völlig augenlose Fliegen und solche mit Augenresten vorgenommen werden mußte. Deshalb wurden die frischgeschlüpften Tiere stündlich mit einem Exhauster direkt aus den Gefäßen mit Nährmedium abgesammelt und unter der Stereolupe getrennt nach augenlosen und Tieren mit Augenresten ausgezählt.

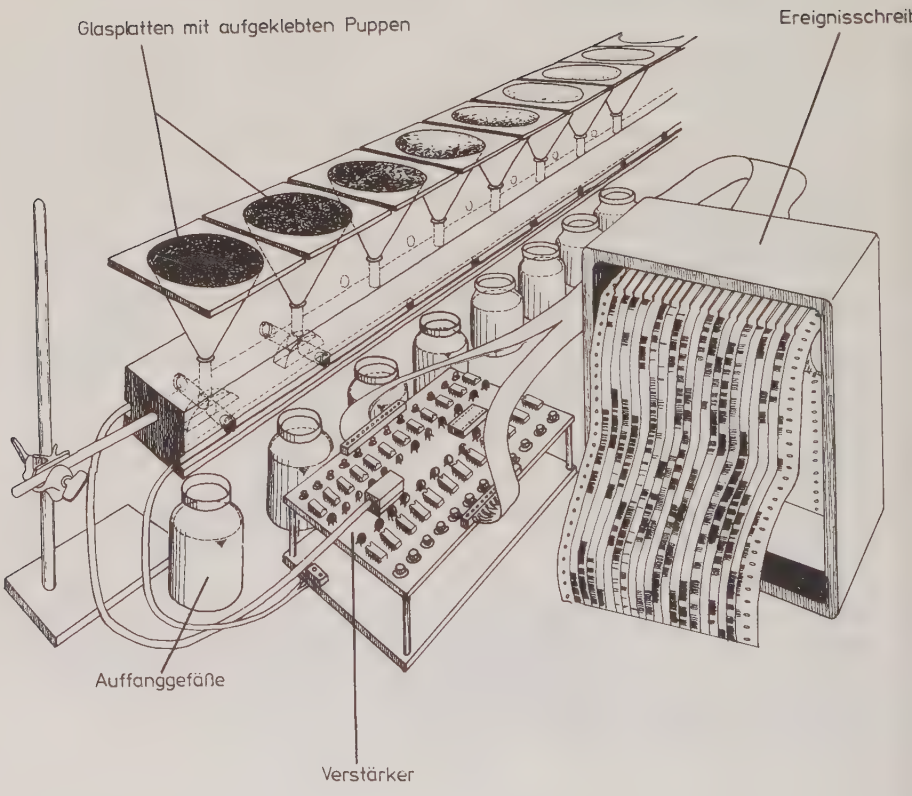


Abb. 3: Registrierung der Schlüpfrhythmik. Schlüpfende Fliegen passieren beim Fallen die Lichtschranke und lösen einen elektrischen Impuls aus, der verstärkt wird und das Relais des betreffenden Kanals auf dem Ereignisschreiber zum Ansprechen bringt. Die so erzeugten Striche können ausgezählt werden (nach Engelmann und Klemke, 1983).

B.1.3. Versuchsdurchführung

In der Versuchskammer herrschte eine Temperatur von 20°C ± 0,5°C und schwaches Rotlicht (RR) (Rotlichtlampe: Leuchtstoffröhre Philips TL 20W/25A 032 und Filter von Rank Strand, Cinemoid Nr.6 "Primary Red").
Die Leuchtstoffröhre befand sich über der Eingangstür der Klimakammer, weshalb die Ausleuchtung der Kammer nicht gleichmäßig war. Die der Lichtquelle am nächsten liegenden Kanäle wurden mit einer Lichtintensität von 9×10^{-8} W/cm^2 beleuchtet, die am weitesten entfernten mit 6×10^{-8} W/cm^2.
Diese graduellen Unterschiede wurden bei der Bestimmung von Periodenlängen im Freilauf nicht berücksichtigt.

Unter diesen Bedingungen wurde die Laufaktivitätsrhythmik im Freilauf und die Schlüpfrhythmik aller Mutanten bestimmt.

B.1.3.1. Laufaktivitätsrhythmik

Die Fliegen waren höchstens 5 Tage alt, als sie in den Versuch genommen wurden. Die Übertragung in die Plexiglasschälchen erfolgte mit einer Federstahlpinzette nach sehr kurzer Chloroformbetäubung, da bei sol;so und mnb;so völlig augenlose Tiere unter der Stereolupe herausgesucht werden mußten.
Die Versuchsdauer richtete sich nach der Lebensdauer der Fliegen und betrug mindestens sieben Tage. Kürzer lebende Fliegen wurden nicht berücksichtigt.

Das Verhalten einiger augenloser Mutanten wurde nach Messen des Freilaufs auch im LD 12:12 untersucht. Dabei wurde in der Lichtperiode Weißlicht (Osram L 65W/25A Universalweiß) der folgenden Lichtintensitäten verwendet: 300 lux
40 lux
8 lux
1 lux

Außerdem wurde das Verhalten von sol;so in einem 16tägigen Temperaturzyklus 12:12 (im RR) untersucht. Die Temperatur in der "Warmperiode" betrug 22,2°C, in der "Kaltperiode" 20,2°C.

B.1.3.2. Schlüpfrhythmik

Zur Aufzucht der Fliegen für die Schlüpfrhythmik wurde das Nährmedium in Plastikschüsseln (22 cm Durchmesser, 10 cm Tiefe) gefüllt, die mit einer Glasplatte abgedeckt wurden. Zur Belüftung dienten zwei kreisförmige mit Gaze bespannte Löcher (3 cm Durchmesser).
Die Fliegen wurden nach kurzer Kältebetäubung überimpft und unter Konstantbedingungen von 20°C + 3°C und LD (12:12) gehalten (Weißlicht von 550 lux (Osram L 65W/77R) in der Lichtperiode). Nach 15 Tagen wurden die Puppen vorsichtig mit einem feuchten Schwamm von den Wänden der Plastikschüssel und der Glasplatte in 20°C warmes Wasser geschwemmt, von der Wasseroberfläche abgesammelt, gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und schließlich auf die Glasplatten aufgeklebt.
Die Überführung in Versuchsbedingungen (RR) erfolgte bei Licht-aus des LD.
Bei so und den Doppelmutanten wurden die ganzen Plastikschüsseln, ohne vorheriges Auswaschen der Puppen zu diesem Zeitpunkt in RR gebracht.

Die Schlüpfrhythmik konnte in der Regel sieben Tage lang gemessen werden. Dann schlüpften kaum noch Tiere und der Versuch wurde abgebrochen.

B.1.4. Auswertung

B.1.4.1. Laufaktivitätsrhythmik

Die von jedem Tier erhaltenen fortlaufenden Aufzeichnungen auf dem Schreiberpapier wurden in Abschnitte von 24 Stunden geteilt und diese untereinander aufgeklebt. Auf diese Weise entstand ein Aktogramm von jedem Tier (siehe Abb. 2).
Die über den Microprocessor erfaßten Daten wurden durch ein spezielles Programm umgewandelt und auf einem Punktdrucker (NEC PC-8023B-C) ebenfalls als Aktogramm ausgedruckt.
Beide Aktogrammarten unterschieden sich nicht systematisch.

Zur Beurteilung der Aktivitätsmuster wurden zwei Methoden angewendet:

Auswertung mittels Schablone

Durch die aufeinanderfolgenden Aktivitätsbeginne der Fliegen wurde eine Gerade gelegt und nach deren Steigung die Periodenlänge mit Hilfe einer Schablone bestimmt (Wiedenmann, 1978).

Waren die Aktivitätsbeginne nicht genau zu bestimmen, aber eine deutliche, periodische Hauptaktivität zu erkennen, so wurde die Gerade durch diese gelegt.
Gab es nach Augenmaß mehrere Rhythmen nebeneinander oder aufeinanderfolgend, so wurde die Periodenlänge von allen bestimmt.

Einlesen der Daten in den Computer und Auswertung durch Zeitreihenanalyse

Die Analyse mittels elektronischer Datenverarbeitung erfolgte mit dem Programm "Timesdia" zur Zeitreihenanalyse (Martin, 1978) am TR 440 - System des Tübinger Rechenzentrums.

Mittels "Periodogrammanalyse" wurden die Periodenlängen der einzelnen Tiere bestimmt. Die Vertrauenswahrscheinlichkeit wurde auf 95 % festgelegt.
Das Verfahren der "komplexen Demodulation" wurde angewandt, um Aufschluß über die Konstanz der Periodenlänge und eventuelle Phasensprünge zu bekommen.
Das Vorhandensein zweier Periodenlängen nebeneinander wurde getestet, indem eine der beiden eliminiert wurde (durch "Signal average" mit Bestimmung der Residuen) und von den übriggebliebenen Daten nochmals eine Periodogrammanalyse und eine "komplexe Demodulation" gemacht wurde.

Aufgrund aller Auswertungsmethoden konnten die Fliegen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (siehe Ergebnisse 8.2.1.1.).

B.1.4.2. Schlüpfrhythmik

Zur Bestimmung der Schlüpfmaxima wurde die Anzahl der pro Stunde geschlüpften Fliegen auf dem Schreiberpapier ausgezählt und als Histogramm in Stundeneinheiten aufgetragen.
Beginn und Ende der einzelnen Schlüpfmaxima wurden bestimmt und deren Medianwerte berechnet. Als Medianwert wird der Zeitpunkt eines Schlüpfmaximuns bezeichnet, zu dem 50 % der Fliegen geschlüpft sind.
Die Periodenlänge berechnet sich aus der durchschnittlichen Zeit zwischen den Medianwerten.

Zum besseren Vergleich des Schlüpfmusters der verschiedenen Mutanten wurden die Schlüpfmaxima in Abbildungen auf jeweils 100 % geschlüpfte Fliegen normiert.

B.1.5. Statistik

Zum Testen der Signifikanz der Ergebnisse wurden nichtparametrische Testverfahren wie der X^2-Test, Mann-Whitney-U-Test, Wilcoxon-Test und Spearman-Rang-Korrelationstest verwendet (Siegel, 1956).

B.1.6. Färbung der neurosekretorischen Zellen

Die Färbung von neurosekretorischen Zellen beruht auf der Bindung von basischen Farbstoffen an saure und von sauren Farbstoffen an basische neurosekretorische Produkte.
Neurosekretorische Produkte sind in der Regel basisch und werden durch saure Farbstoffe angefärbt. Durch starke Oxidation werden manche jedoch sauer und binden somit basische Farbstoffe. Die Umwandlung ins Saure ist abhängig vom Typ der neurosekretorischen Zellen. Neurosekretorische Zellen vom Typ A zeigen die oben genannte Reaktion in sauren pH, während solche vom Typ B vorwiegend basisch bleiben.
Der hier verwendete Farbstoff Paraldehydfuchsin ist basisch und färbt deshalb neurosekretorische Zellen vom Typ A besonders gut an. Durch geeignete Wahl des pH-Werts der Färbelösung war jedoch

auch eine Anfärbung der Zellen vom B-Typ möglich. Nicht angefärbt wurden Zellen vom Typ C. Sie benötigen nach Raabe (1982) eine Fixierung in Helly's-Flüssigkeit und Färbung durch Azocarmin.

B.1.6.1. Präparation und Fixierung der Gehirne

Gehirne von Fliegen verschiedener Altersstufen wurden mit Hilfe zweier feiner Pinzetten freipräpariert und nach Möglichkeit völlig von anhaftendem Fettkörper und Tracheen befreit. Die Präparation erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung (Rezept siehe Anhang) unter der Stereolupe und dauerte ungefähr 10 Minuten. Danach wurden die Gehirne für drei Stunden in Bouin'scher Flüssigkeit fixiert (Zusammensetzung siehe Anhang).

B.1.6.2. Färbung und Einbettung der Gehirne

Die fixierten Gehirne wurden als Ganzes gefärbt und eingebettet. Zunächst wurden sie mehrmals in einer gesättigten Lösung von Li_2CO_3 ausgewaschen, um alle Reste von Bouin'scher Lösung zu entfernen. Die Oxidation erfolgte nach Übergang in wässrige Lösung durch ein 1:1 Gemisch aus $KMnO_4$ und H_2SO_4. Gestoppt wurde sie durch $Na_2S_2O_5$. Nach erneutem Übergang in 70 % Ethanol erfolgte die Färbung in Paraldehydfuchsin. Nach Auswaschen wurden die Gehirne völlig entwässert und über Nacht in Zedernöl aufbewahrt, um sie transparent zu machen. Das Zedernöl wurde mit Xylol entfernt und die Gehirne in DePeX eingebettet.
(Genaues Vorgehen und Rezepte für die Färbelösung siehe Anhang.)

B.1.6.3. Auswertung der Präparate

Die beste Qualität hatten die Präparate zehn Tage bis drei Monate nach der Einbettung.
Zur mikroskopischen Auswertung stand ein Fotomikroskop (Zeiss G 41-170) zur Verfügung. Alle Aufnahmen wurden zwei Monate nach der Einbettung gemacht. (Zu späteren Zeitpunkten wurde eine leichte Entfärbung der Präparate beobachtet.)
Nur Zellen, die eindeutig ein stark gefärbtes Cytoplasma und eine ungefärbte Kernregion aufwiesen, wurden als neurosekretorische

Zellen angesehen und ihre Lage und Zahl bestimmt (vgl. Köpf, 1957; Rensing, 1966 a).

8.2. Ergebnisse

8.2.1. Laufaktivität

8.2.1.1. Freilaufversuche

Mit Hilfe der Computerauswertung und der Auswertung nach den Aktivitätsbeginnen durch Schablone konnten die Fliegen in drei Gruppen eingeteilt werden (Helfrich und Engelmann, 1983):

1) Tiere mit einer deutlichen und durchgehenden Periode.

Definition: Die Periodogrammanalyse zeigte nur eine signifikante Periodenlänge. Diese konnte durch komplexe Demodulation im untersuchten Bereich als konstantbleibend bestätigt werden.
Bei der Auswertung mittels Schablone war es möglich, eine gerade Linie durch die Aktivitätsbeginne oder zumindest durch die Hauptaktivität zu legen.

2) Tiere mit komplexer Rhythmik.

Definition: Die Periodogrammanalyse zeigte mehrere signifikante Periodenlängen oder , wenn nur eine gefunden wurde, erwies sich diese nach komplexer Demodulation als nicht stabil. Dabei betrugen die Schwankungen in der Periodenlänge meist mehr als zwei Stunden. Bei der Auswertung mittels Schablone war es entweder unmöglich , im ganzen Untersuchungszeitraum durchgehende Linien durch Aktivitätsbeginne oder Hauptaktivitäten zu legen, oder es konnten mehrere durchgehende, sich überkreuzende Periodenlängen ausgemessen werden.

3) Arrhythmische Tiere.

Definition: Die Periodogrammanalyse ergab keine signifikante Periodenlänge.
Die optische Beurteilung zeigte eine gleichmäßige Aktivität über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg. Lediglich eine Unterteilung in hyperaktive, durchschnittlich aktive und fast inaktive Fliegen war möglich.

Diese Gruppeneinteilung wurde bei allen Stämmen gemacht.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über den prozentualen Anteil der drei Gruppen in jedem Stamm. Zum Vergleich wurden die Werte für die Mutanten so und sol aus Helfrich und Engelmann (1983) übernommen.

Tabelle 1

Prozentualer Anteil von rhythmischen, arrhythmischen und Fliegen mit komplexer Rhythmik beim Wildtyp und den untersuchten Mutanten.

	n	klare Rhythmik	komplexe Rhythmik	Arrhythmie
WT_B	66	80,3 %	13,6 %	6,1 %
omb	19	84,2 %	0,0 %	15,8 %
lop	26	92,3 %	7,7 %	0,0 %
mnb	16	81,3 %	6,2 %	12,5 %
sol	36	83,3 %	13,9 %	2,8 %
so	109	67,9 %	25,7 % ^{o}	6,4 %
mnb;so	32	0,0 %	81,3 % *	18,7 %
sol;so	49	0,0 %	85,7 % *	14,3 %
per^{0}	54	0,0 %	40,7 % *	59,3 % *
(per^{s}	9	77,8 %	11,1 %	11,1 %)

* signifikant erhöhter Prozentsatz im Vergleich zum Wildtyp bei $\alpha' = 0,01$ (χ^2 - Test)
^{o} signifikant bei $\alpha' = 0,1$

Nähere Untersuchung der Fliegen mit komplexer Rhythmik

Wie aus der Definition (siehe vorige Seite) zu ersehen ist, sind in dieser Gruppe Fliegen mit verschiedenartigen Aktivitätsmustern zusammengefaßt.
Einmal sind es Tiere, bei denen nur zeitweise eine Rhythmik zu erkennen ist, Tiere, deren Rhythmik nicht sehr deutlich ist, ihre Periodenlänge ändert, oder Tiere, deren Aktivität nach kurzer Zeit in Arrhythmie übergeht. Diese Art von komplexer Rhythmik wurde bei den meisten per0 Mutanten gefunden. Abb. 4 zeigt Beispiele.

Zum anderen gibt es Fliegen mit komplexer Rhythmik, deren Aktivitätsmuster aus mehreren voneinander unabhängigen Komponenten zusammengesetzt ist (Abb. 5). Dabei sind Fliegen, die genau zwei Periodenlängen gleichzeitig zeigen, sehr häufig (Abb. 6). Bei den Doppelmutanten **mnb;so** und **sol;so** war der Anteil solcher Fliegen besonders hoch, aber auch bei den anderen Mutanten und selbst beim Wildtyp kamen sie vor.

Tabelle 2 zeigt für die verschiedenen Mutanten, wie hoch der Anteil an Fliegen mit zwei Periodenlängen bei Fliegen mit komplexer Rhythmik war. Die Beurteilung erfolgte visuell nach den Aktogrammen.

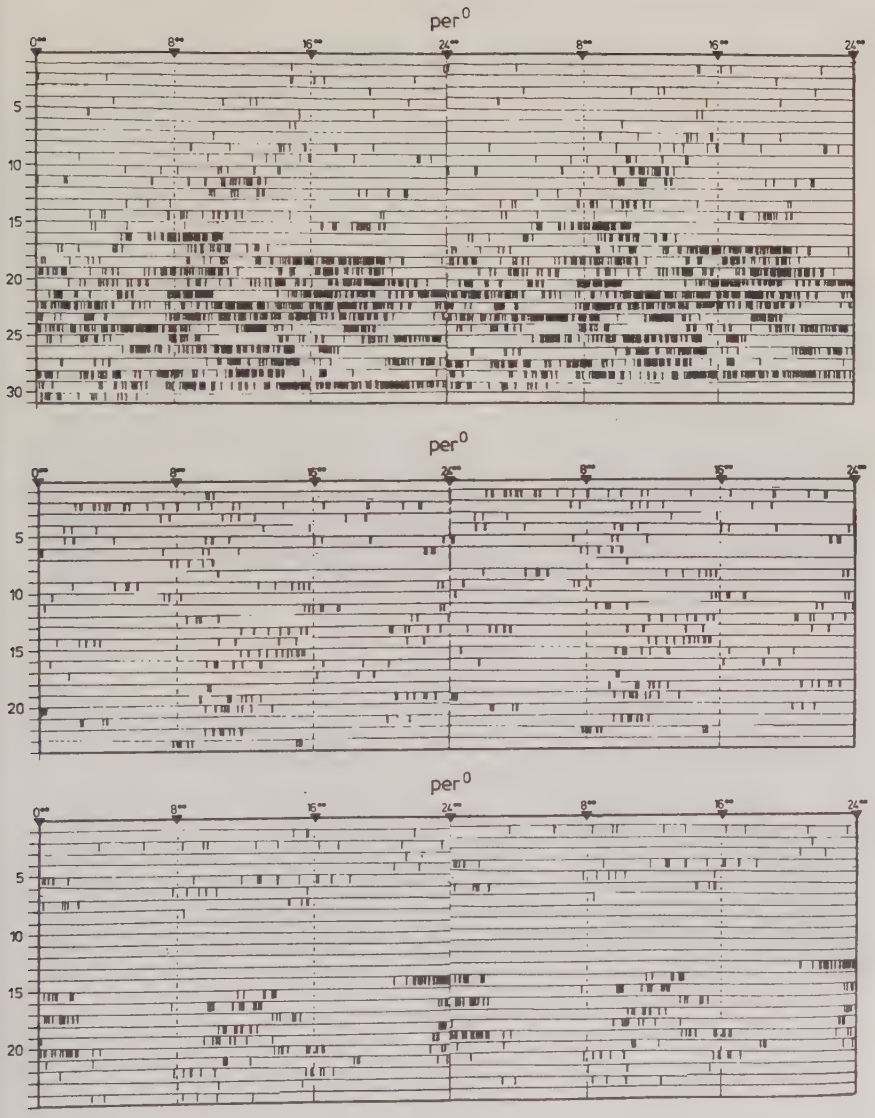


Abb. 4: Aktogramme von per^0-Mutanten mit noch vorhandener "Restrhythmik" im RR. Sie wurden zur Gruppe der Fliegen mit komplexer Rhythmik gerechnet.

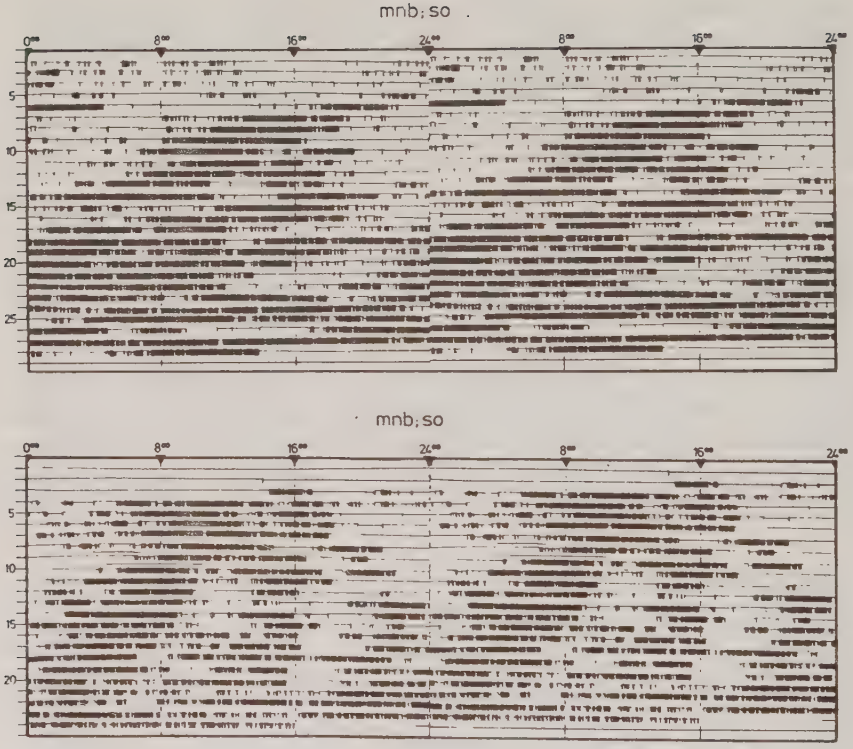


Abb. 5: Aktogramme der Mutante mnb;so, deren Aktivitätsmuster aus mehreren Komponenten zusammengesetzt ist.

Tabelle 2

Anteil der Tiere mit zwei Periodenlängen an der Gesamtzahl der Tiere mit komplexer Rhythmik (n).

	n	Tiere mit 2 τ's	%
wT_B	9	2	22,2
lop	2	1	50,0
mnb	1	0	0,0
sol	5	2	40,0
so	28	14	50,0
mnb;so	26	22	84,6
sol;so	42	38	90,5
per^0	22	1	4,0
per^s	1	0	0,0

Leider konnten nicht alle Fliegen zusätzlich durch Periodogrammanalyse beurteilt werden, da nach Stillegung der TR 440 durch das Rechenzentrum das Timesdia-Programm nicht mehr zur Verfügung stand. Die ersten Versuche mit den Doppelmutanten wurden noch mit dem Programm analysiert. Die Ergebnisse der Periodogrammanalyse stimmten mit den visuellen Beobachtungen überein.
In Abb.7 sind zur Übersicht die von den einzelnen Tieren erhaltenen Periodogramme für wT_B, mnb;so und sol;so übereinander gezeichnet. In der Abbildung ist bei den Doppelmutanten die Aufspaltung der Rhythmik in zwei Komponenten erkennbar.

Bei mnb;so ist stets die längere Komponente dominant, während bei sol;so beide gleichberechtigt erscheinen. Die visuelle Beurteilung nach den Aktogrammen ergab dasselbe Bild: Die kürzere war bei mnb;so manchmal nur ansatzweise zu erkennen und lief selten ganz ohne Unterbrechung durch (Abb. 6b).
Bei sol;so war ebenfalls meistens die längere Komponente stärker

ausgeprägt. Es gab aber auch Tiere, bei denen die kürzere dominierte oder beide gleich stark waren (Abb. 6d).

Neben Fliegen mit zwei sich überkreuzenden Periodenlängen, traten solche auf, die "Splitting" in zwei Komponenten zeigten, welche eine Phasenbeziehung von 180° beibehielten (Abb. 6a). Dieses "Splitting" war bei mnb;so besonders häufig zu beobachten und ging stets von der längeren Periodenlänge aus. Inwieweit die kürzere mit einbezogen ist, ist unklar. In Abb 6 a gibt es Anzeichen dafür, daß sie sich auch nach "Splitting" in der langen Periodenlänge noch andeutungsweise durch das Aktogramm zieht.

Periodenlängen der verschiedenen Mutanten

Die Periodenlängen wurden bei allen Tieren mit Ausnahme einiger Doppelmutanten durch Periodogrammanalyse bestimmt. Bei drei Tieren der Mutante mnb;so und 20 Tieren der Mutante sol;so konnte die Periodenlänge nur mittels Schablone bestimmt werden, da das Timesdiaprogramm zum Zeitpunkt der Auswertung nicht zur Verfügung stand. Da es jedoch bei den ersten Tieren keinen Unterschied zwischen Periodenlängenbestimmung per Periodogrammanalyse und direkt nach dem Aktogramm gab, wurden alle Periodenlängen zur Mittelwertsberechnung herangezogen.

Tabelle 3 zeigt die durchschnittlichen Periodenlängen der verschiedenen Mutanten, sowohl bei klarer als auch bei komplexer Rhythmik.
Bei per0 wurde wegen der undeutlichen Rhythmik auf eine Periodenlängenbestimmung ganz verzichtet.

Abb. 6: Fliegen, deren Aktivitätsmuster zwei Komponenten gleichzeitig zeigt:

a) splitting
b) τ_1 von 24,9 Std. dominiert. Ansatzweise ist eine kürzere Periodenlänge von τ_2 = 21,3 Std. zu erkennen, die besonders an den Kreuzungspunkten mit τ_1 in Erscheinung tritt.
c) Die längere Periodenlänge (τ_1 = 25,2 Std. ist etwas deutlicher als die kürzere (τ_2 = 21,4 Std.).
d) Kurze (21,2 Std.) und lange (25,6 Std.) Periodenlänge sind etwa gleich stark ausgeprägt.

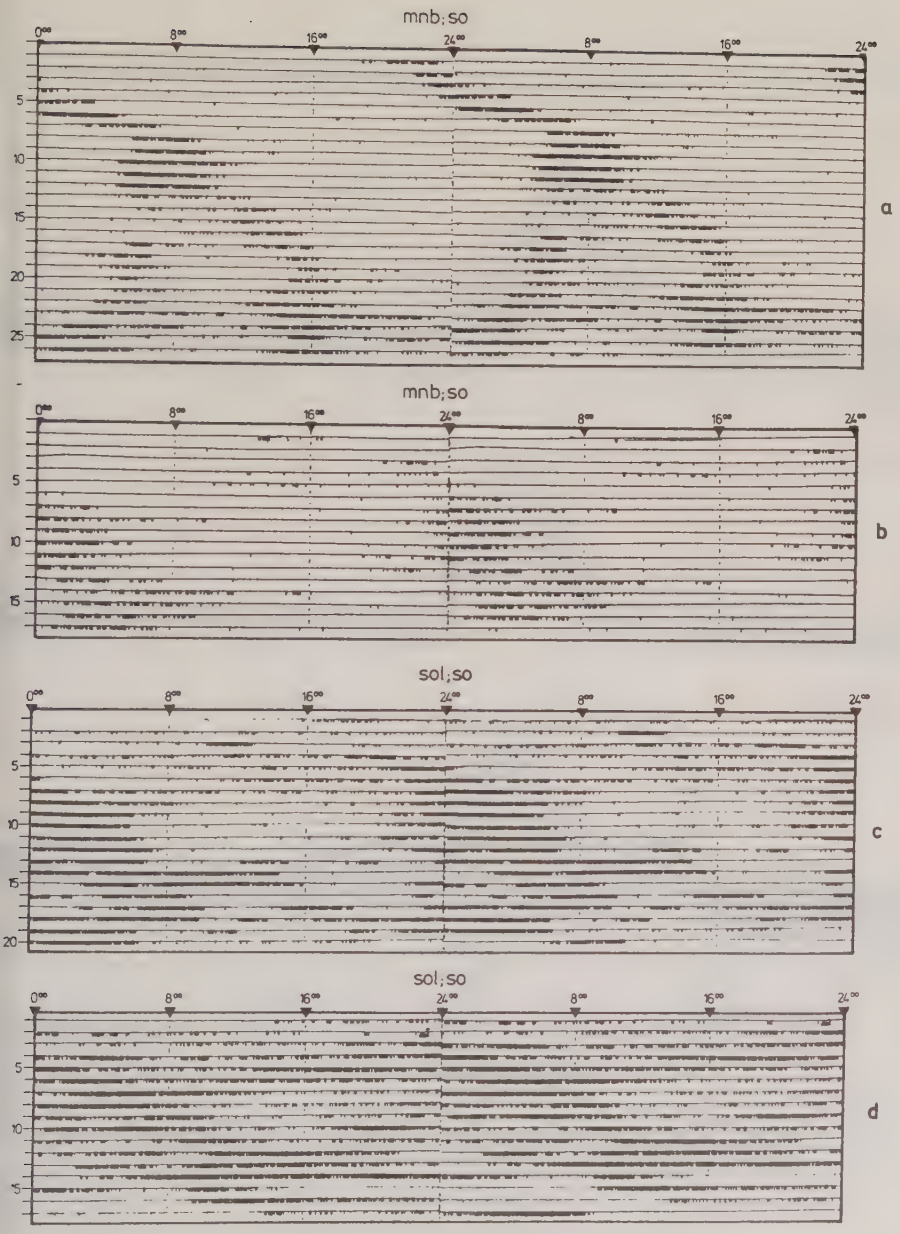

mnb;so
0°°
8°°
16°°
24°°
8°°
16°°
24°°
5
10
15
20
25
a
mnb;so
0°°
8°°
16°°
24°°
8°°
16°°
24°°
5
10
15
b
sol;so
0°°
8°°
16°°
24°°
8°°
16°°
24°°
5
10
15
20
c
sol;so
0°°
8°°
16°°
24°°
8°°
16°°
24°°
5
10
15
d

Abb. 6.

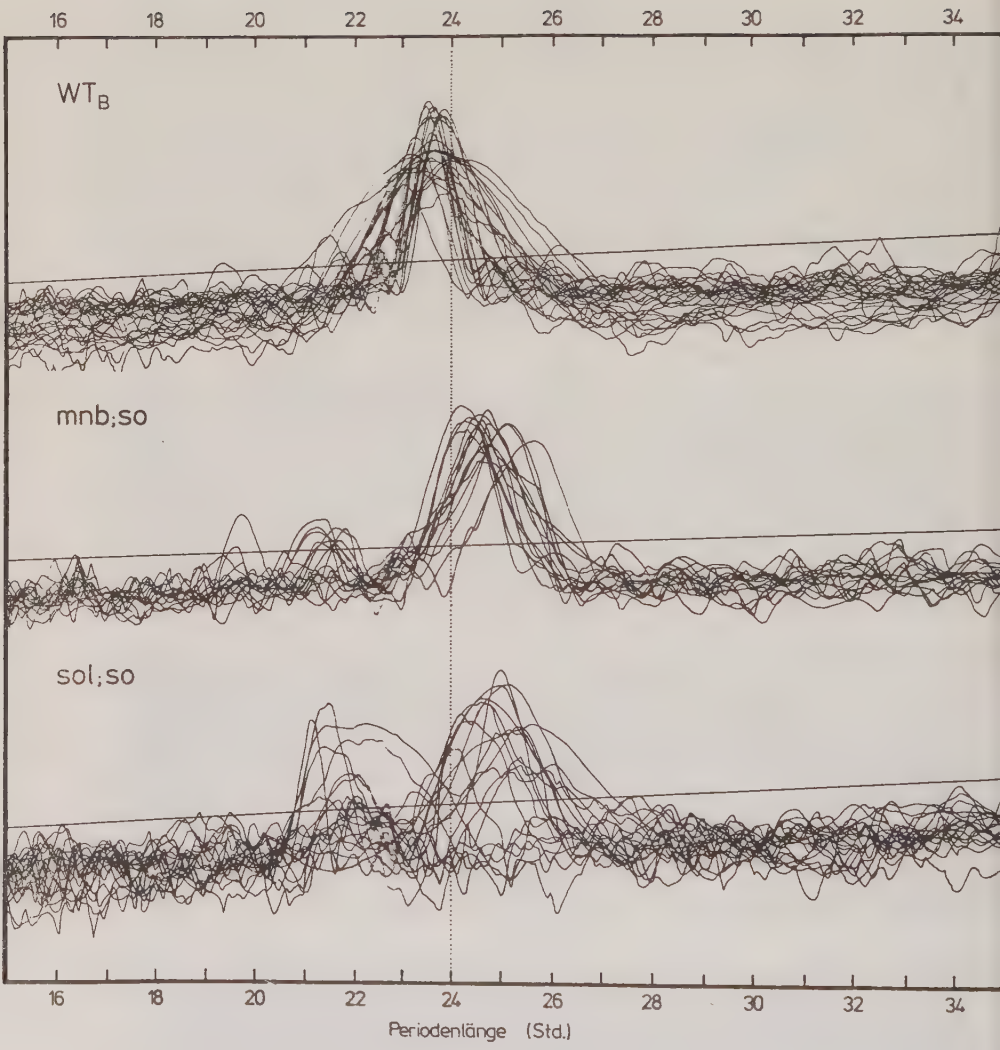


Abb. 7: Periodogramme einzelner Tiere vom Wildtyp und den Doppelmutanten **mnb;so** und **sol;so** übereinandergezeichnet.

Tabelle 3

Durchschnittliche Periodenlängen der untersuchten Mutanten in Stunden mit Angabe der Standardfehler.

	n	klare Rhythmik	n	komplexe Rhythmik
WT_B	53	23,6 ± 0,05		
omb	16	23,5 ± 0,09		
lop	24	23,6 ± 0,07		
mnb	13	23,5 ± 0,05		
sol	27	23,7 ± 0,05		
so	74	24,1 ± 0,05 *	14	22,9 ± 0,09 * / 25,2 ± 0,10 *
mnb;so			22	21,4 ± 0,19 * / 25,1 ± 0,09 *
sol;so			38	21,3 ± 0,14 * / 25,5 ± 0,10 *
per^s	7	19,6 ± 0,11 *		

* signifikant längere (bzw. kürzere) Periodenlänge im Vergleich zum Wildtyp bei $\alpha' = 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test).

Arrhythmische Fliegen

Der Aktivitätsspiegel der Fliegen wurde aus den Aktogrammen ermittelt, indem jedem 20min.-Intervall ein "Aktivitätswert" zugeordnet wurde, der von null (keine Aktivität) bis vier (Hyperaktivität) reichte.

Ein Tier wurde als hyperaktiv eingestuft, wenn seine mittlere Aktivität zwischen den Werten 3 und 4 lag, als fast inaktiv, wenn sie unter dem Wert 0,5 lag. Abb.8 zeigt entsprechende Aktogramme. Dazwischen liegende Werte wurden als durchschnittlich aktiv gewertet.

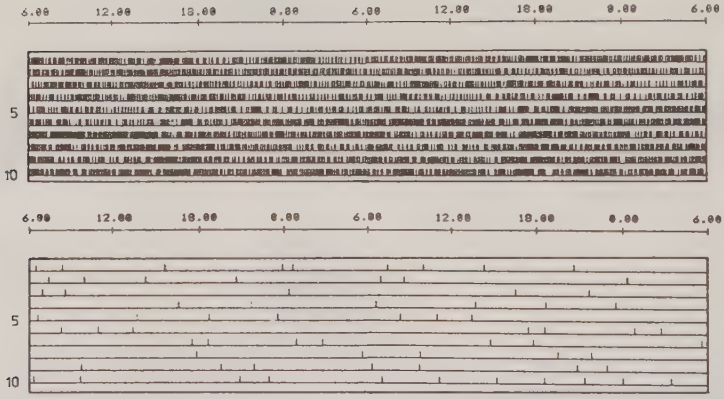


Abb. 8: Arrhythmische Fliegen, die als hyperaktiv (a) und fast inaktiv (b) eingestuft wurden.

Tabelle 4 gibt die Verteilung der drei Aktivitätsgrade für die verschiedenen Mutanten wieder.

Tabelle 4

Verteilung von Hyperaktivität, durchschnittlicher Aktivität und Inaktivität bei arrhythmischen Fliegen

	n	fast inaktiv	durchschn. aktiv	hyperaktiv
WT_B	4		100,0 %	
omb	3		66,7 %	33,3 %
mnb	2	100,0 %		
sol	1	100,0 %		
so	7	42,9 %	57,1 %	
mnb;so	6	33,3 %	66,7 %	
sol;so	7	14,3 %	71,4 %	14,3 %
per^0	32	28,1 %	68,8 %	3,1 %

8.2.1.2. Synchronisation von sol;so und per0 durch einen Licht-Dunkel-Wechsel (LD 12:12)

Ergebnisse beim Wildtyp und der Mutante so

Die Synchronisation auf LD erfolgt bei Wildtyp-Fliegen und **so** sehr schnell, ohne nennenswerte Transients (Helfrich und Engelmann, 1983).

Im LD zeigen die meisten Fliegen ein bimodales Aktivitätsmuster: Die Aktivität beginnt unmittelbar mit "Licht-an", läßt dann etwas nach und wird, drei Stunden bevor das Licht ausgeht, wieder sehr stark (Mack, 1980). In der Dunkelperiode sind die Fliegen nahezu inaktiv. Die Mutante so zeigt dasselbe Aktivitätsmuster wie der Wildtyp (Helfrich und Engelmann, 1983). Dabei betrug die zur Synchronisation verwendete Lichtstärke bei so und den meisten Wildtyp-Fliegen 400 lux: einige Wildtypen wurden bei 40 lux in der Lichtperiode registriert, was jedoch keinen großen Einfluß auf das Aktivitätsmuster hatte.

Versuche mit sol;so-Mutanten

Bei 24 sol;so-Mutanten wurde die Aktivität im LD bei 300 lux aufgezeichnet und 28 wurden bei 40 lux registriert. Bei sechs Fliegen wurde die Lichtintensität in Stufen bis zu 10 lux bzw. 1 lux abgesenkt.

Alle untersuchten Fliegen waren bis zur Lichtintensität von 1 lux eindeutig synchronisiert. Allerdings zeigten sie (mit drei Ausnahmen) ein zum Wildtyp verändertes Synchronisationsmuster:

Bei 300 lux traten typischerweise zwei Aktivitätsbänder auf. Das erste begann kurz vor oder bei Licht-an, das zweite 3 bis 0 Stunden vor Licht-aus und erstreckte sich 1 bis 4 Stunden in die Dunkelperiode (Abb. 9, 14, 15 a). Das zweite Aktivitätsband war stets deutlicher. Zwischen den beiden Aktivitätsbändern waren die meisten Fliegen kaum aktiv. Die wenigen Ausnahmen waren entweder bevorzugt in der Lichtperiode oder aber noch häufiger in der Dunkelperiode aktiv.
Bei 40 lux fehlte das erste Aktivitätsband und das zweite war breiter und schwankte interindividuell stärker in der Phasenlage zu Licht-aus (Abb. 10).

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die beobachteten Aktivitätsmuster bei den beiden Lichtintensitäten.

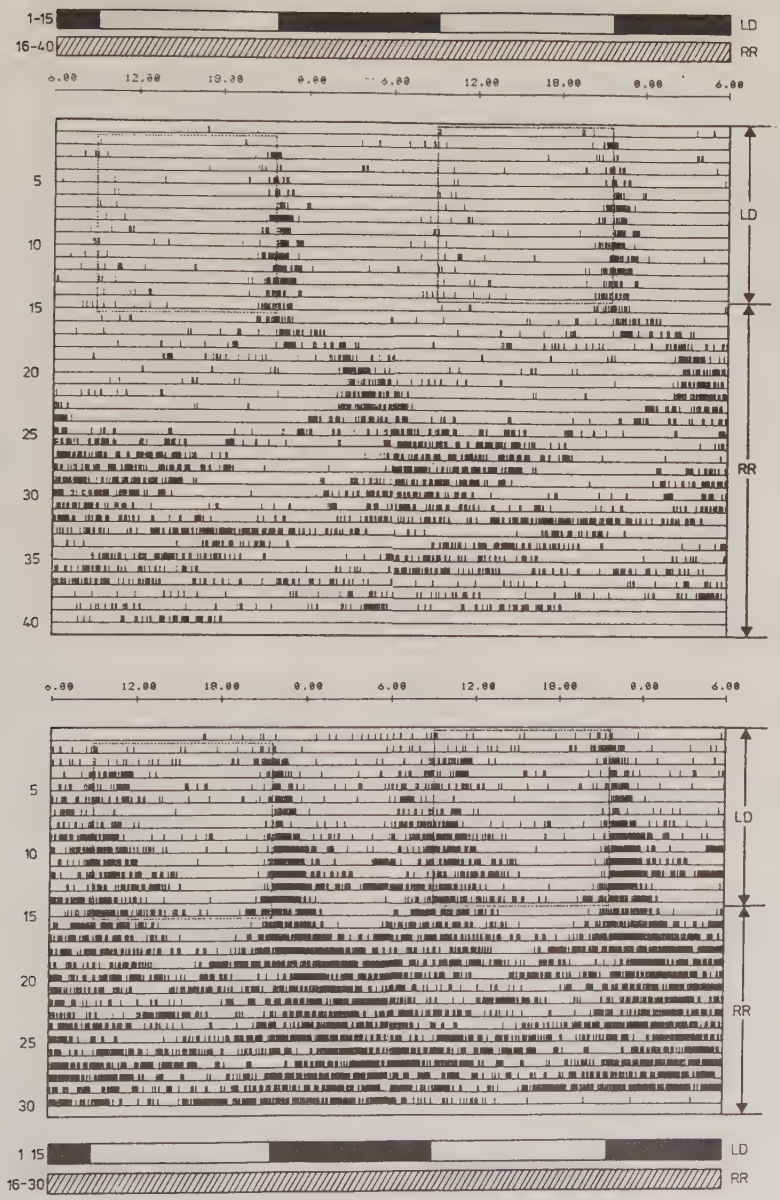


Abb. 9: Verhalten von sol;so im LD (300 lux) und nach Übergang in RR.

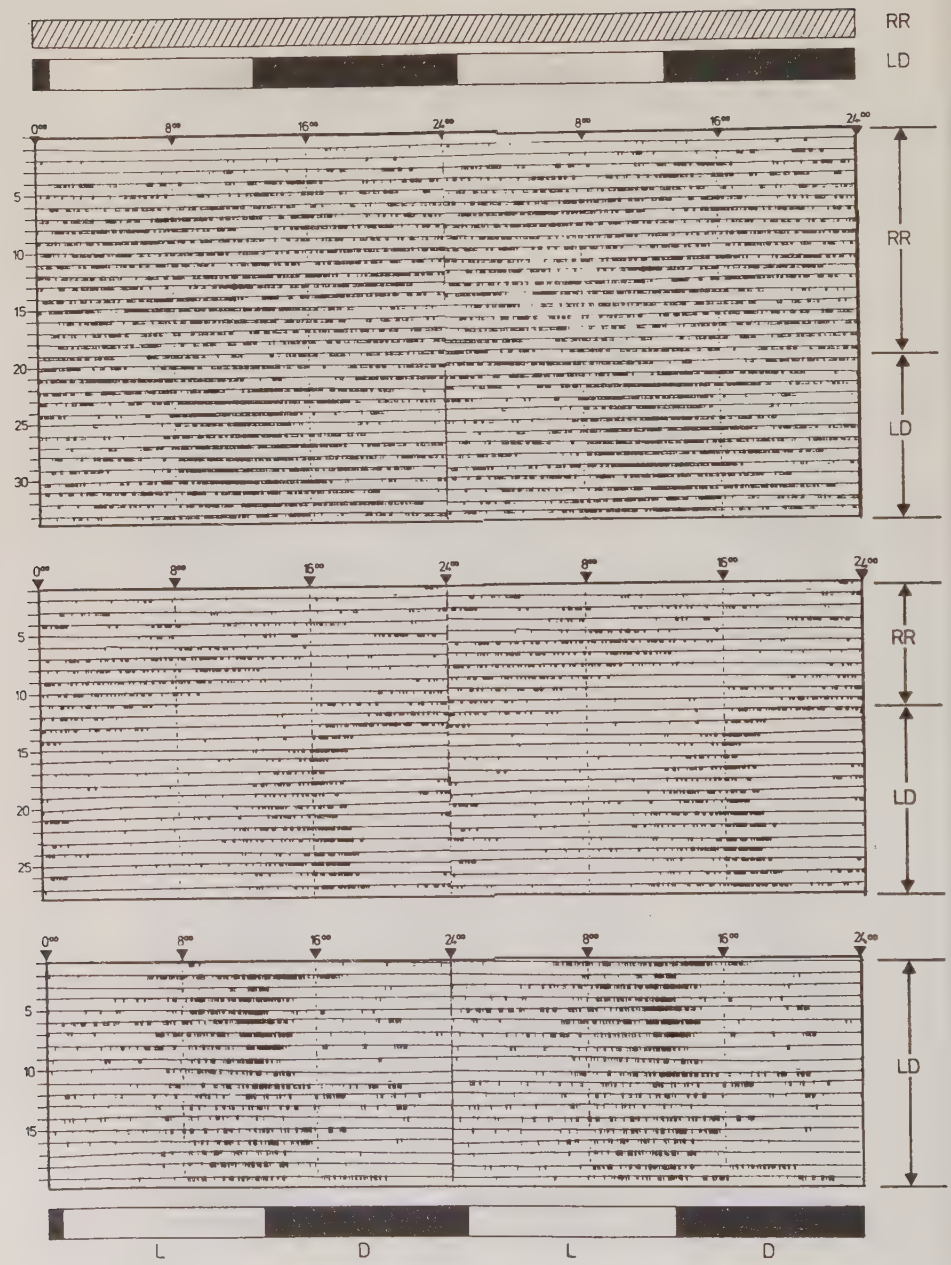


Abb. 10: Verhalten von **sol;so** im LD (40 lux).

Tabelle 5

Beobachtete Aktivitätsmuster bei **sol;so** im LD 12:12 bei 300 lux und 40 lux.

	n	Aktivitätsbänder bei Licht-an u. Licht-aus			nur Aktivität bei Licht-aus		Aktivitäts-muster wie beim Wildtyp
		wenig Aktivität dazwischen	Aktivität dazwischen in d. Lichtphase	Aktivität dazwischen in d. Dunkelphase	breites Aktivitätsband	schmales Aktivitätsband	
300 lux	24	54,2 %	12,5 %	16,7 %	4,1 %	8,3 %	
			83,4 %			12,4 %	4,2 %
40 lux	28	7,1 %	0,0 %	3,6 %	35,7 %	42,9 %	
			10,7 %			78,6 %	10,7 %

Beim weiteren Absenken der Lichtintensität auf 1 lux blieb bei drei von sechs Tieren das Aktivitätsmuster wie bei 40 lux (schmales Aktivitätsband um den Zeitpunkt Licht-aus); bei zwei Fliegen, die bei 40 lux wie der Wildtyp synchronisiert waren, traten nun zwei Aktivitätsbänder auf: ein schwächeres bei Licht-an und ein deutlicheres bei Licht-aus. Bei einem Tier, welches bei 40 lux zwei Aktivitätsbänder zeigte, verschwand das erste und das zweite wurde etwas breiter.

Nähere Charakterisierung des ersten Aktivitätsbandes

Es wurde die Phasenlage des ersten Aktivitätsbandes zu Licht-an ($\Delta \Psi$ L-an) ausgemessen (Tab. 6).

20 der 24 Tiere, die bei 300 lux registriert wurden, zeigten dieses Aktivitätsband. Davon begannen 11 Tiere mit der Aktivität bereits vor L-an, sechs genau mit L-an und drei erst nach L-an.

Bei 40 lux zeigten nur drei Fliegen das erste Aktivitätsband.

Die Breite des ersten Aktivitätsbandes (α_1) war stets ungefähr gleich, ganz unabhängig vom Aktivitätsbeginn. Deshalb ist in Tabelle 6 ein gemeinsamer Mittelwert für α_1 angegeben.

Tabelle 6

Phasenbeziehung des ersten Aktivitätsbandes ($\overline{\Delta\Psi}$ L-an) von synchronisierten sol;so-Mutanten zu Licht-an und Breite dieses Aktivitätsbandes ($\overline{\alpha_1}$). Alle Angaben in Stunden.

	n	$\overline{\Delta\Psi}$ L-an	$\overline{\alpha_1}$	$\overline{\alpha_1}$ gesamt
300 lux	10	+2,55 ± 0,32	4,90 ± 0,16	
	6	0,00	4,08 ± 0,33	
	3	-2,17 ± 1,01	4,50 ± 0,76	4,60 ± 0,21
40 lux	2	+2,50 ± 1,00	4,75 ± 1,75	

Nähere Charakterisierung des zweiten Aktivitätsbandes

Die Phasenlage des zweiten Aktivitätsbandes zu Licht-aus ($\Delta\Psi$ L-aus) konnte von 22 Fliegen bei 300 lux und von 25 Fliegen bei 40 lux bestimmt werden (Tabelle 7).

Bei beiden Lichtintensitäten gab es keine Fliege, die erst nach L-aus aktiv wurde. Bei 300 lux begannen drei Fliegen mit ihrer Aktivität unmittelbar bei L-aus, die übrigen deutlich vor L-aus.

Bei 40 lux war die Phasenbeziehung zu L-aus wesentlich variabler als bei 300 lux. Der Aktivitätsbeginn schwankte von einer Stunde vor L-aus bis zu 6 Stunden vor L-aus. Im Durchschnitt begann die Aktivität signifikant früher als bei 300 lux und die Breite des Aktivitätsbandes (α_2) war größer (Mann-Whitney-U-Test, $\alpha' = 0,01$).

Tabelle 7

Phasenbeziehung des zweiten Aktivitätsbandes ($\overline{\Delta\Psi}$ L-aus) von synchronisierten sol;so-Mutanten zu L-aus und Breite dieses Aktivitätsbandes ($\overline{\alpha 2}$) in Stunden.

	n	$\overline{\Delta\Psi}$ L-aus	$\overline{\alpha 2}$	$\overline{\alpha 2}$ gesamt
300 lux	19 3	+1,66 ± 0,17 * 0,00	4,08 ± 0,27 4,17 ± 0,17	4,10 ± 0,23 *
40 lux	25	+3,68 ± 0,24 *	6,00 ± 0,35	6,00 ± 0,35 *

* signifikant verschieden bei $\alpha' = 0{,}01$

Abhängigkeit der Phasenlage im LD von der vorigen Phasenlage der Fliegen im RR

Da die Fliegen im LD (besonders bei 40 lux) sehr unterschiedliche Phasenbeziehungen zu L-aus zeigen erhebt sich die Frage, ob diese von ihrer vorherigen Phasenlage (im RR) abhängen.

Bei 15 Fliegen wurde die Aktivität einige Tage vor Beginn des LD (40 lux) im RR registriert. In keinem Fall ließ sich ein Verweilen in der ursprünglichen Phasenlage des RR beobachten.
Unabhängig davon, wie groß die dafür notwendigen Phasenverschiebungen waren, gingen die Fliegen ihre charakteristische Phasenbeziehung zum LD ohne nennenswerte Transients (max. zwei Tage) ein (siehe Abb. 10, 14b und 15).

Nach zwei Wochen wurde der LD-Wechsel bei 6 Fliegen um 6 Stunden nach vorne verschoben. Die Fliegen folgten unmittelbar und behielten so ihre ursprüngliche Phasenlage zum LD bei (Abb. 11).

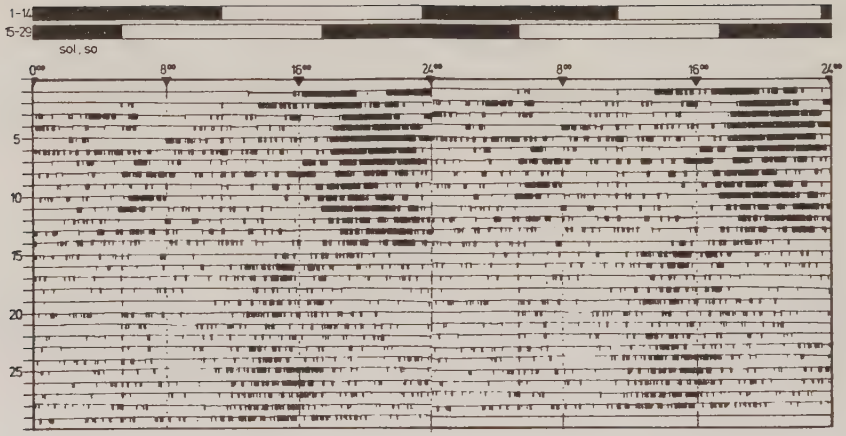


Abb. 11: Aktivität von sol;so im LD (40 lux). Am 15. Tag wurde der LD um 6 Std. nach vorne verschoben. Die Fliege folgte ohne nennenswerte Transients.

Verhalten nach Übergang vom LD in RR

Bei 11 Fliegen wurde die Aktivität nach Beendigung des LD (300 lux) noch einige Tage im RR registriert. Eine Fliege war fast inaktiv und muß von der Beurteilung ausgenommen werden. Eine weitere starb nach 7 Tagen, weshalb nur schwer eine Aussage getroffen werden kann.

Die übrigen neun Fliegen hatten im LD die bereits beschriebenen beiden Aktivitätsbänder bei L-an und L-aus. Beim Übergang zum RR verschwand in den meisten Fällen die L-an-Komponente, während sich die L-aus-Komponente im RR mit einem τ von 25 Stunden fortzusetzen schien. Bei manchen Tieren spaltete sich von dieser Komponente früher oder später noch eine kurze mit $\tau = 21{,}5$ Stunden ab (Abb. 9a).

Welche Rolle die L-an-Komponente aus dem LD spielt, ist unklar. In allen neun Fällen verschwand diese nicht sofort, sondern blieb noch ein bis zwei Tage nach Übergang in RR bestehen. Bei einem Tier war sie länger zu beobachten. Sie lief mit einem $\tau > 24$ Std. frei (Abb. 9b).

Auch beim Wildtyp setzte sich die L-an-Komponente bei manchen Tieren noch im RR fort (Abb. 12).

Synchronisation von per^0

Einige per^0-Mutanten (n = 13) wurden neun Tage im LD 12:12 (mit 3 lux in der Lichtperiode) registriert. Alle waren innerhalb von ein bis zwei Tagen synchronisiert, wobei ihre Aktivität wie beim Wildtyp fast ausschließlich auf die Lichtperiode beschränkt war (Abb. 13).

Bimodalität wurde nur vereinzelt beobachtet (Abb. 13a andeutungsweise).

Nach Übergang vom LD in RR zeigten acht Tiere nicht sofort wieder Arrhythmie, sondern waren ein bis zehn Tage rhythmisch, bis das Aktivitätsmuster schließlich wieder diffuser wurde (Abb. 13b). Der Aktivitätsbeginn schob sich dabei meistens leicht nach hinten, was für ein τ > 24 Std. spricht. Eine genaue Periodenlänge konnte jedoch nicht bestimmt werden.

Abb. 12 (siehe nächste Seite): Verhalten vom Wildtyp im LD und anschließendem RR.

a) Fliege mit unimodalem Aktivitätsmuster im LD. Im anschließenden RR blieb das Aktivitätsband in fast ursprünglicher Breite erhalten.
b) Fliege mit bimodalem Aktivitätsmuster im LD. Beide Komponenten bleiben im RR erhalten und laufen parallel zueinander.
c) Die L-an Komponente scheint sich nach Übergang in RR aufzuspalten. Auffällig ist die Phasenlage im RR und das etwas unregelmäßige Aktivitätsmuster.

Abb. 13 (siehe übernächste Seite): Synchronisation von per^0 im LD 12:12 (3 lux) und Verhalten vor und nach dem LD.

a) Die Fliege wird kurz nach Ende des LD wieder arrhythmisch.
b) Bis ca. 11 Tage nach Ende des LD ist eine Rhythmik zu erkennen. Sie ist biphasisch und hat ein τ > 24 Std.

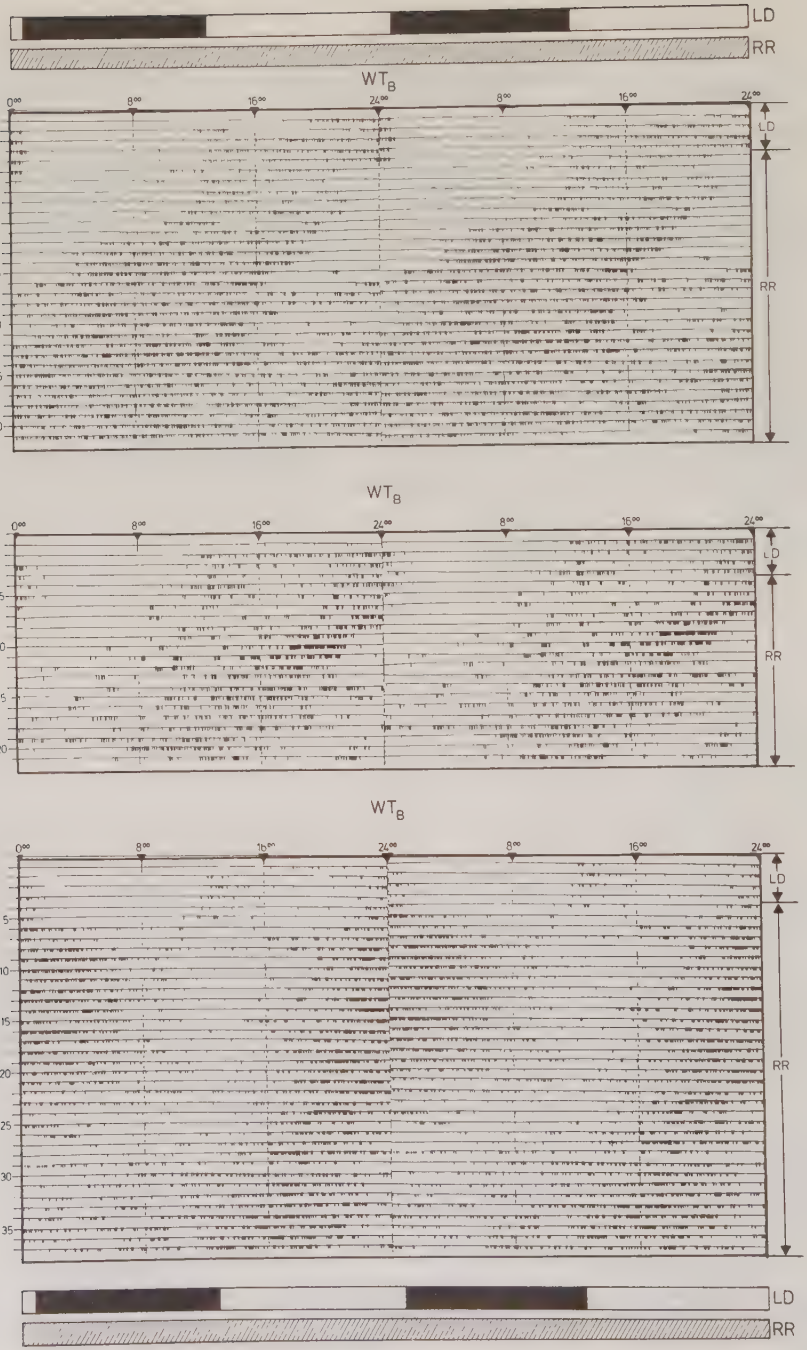


Abb. 12 (Legende siehe S. 39).

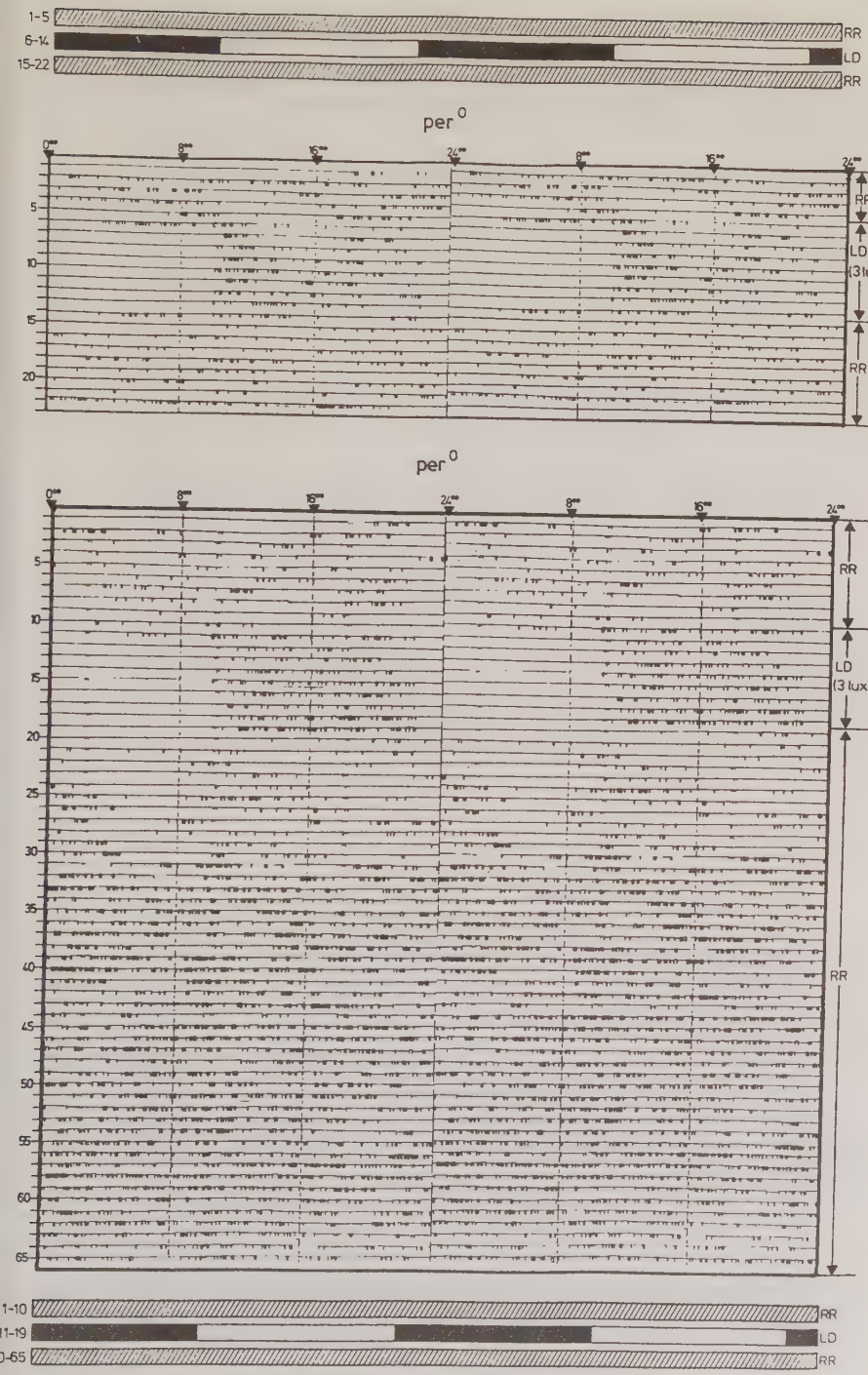


Abb. 13 (Legende siehe S. 39).

8.2.1.3. Synchronisation von Wildtyp-Fliegen und sol;so-Mutanten durch Temperaturzyklen (12:12)

Einige **sol;so**-Mutanten (n = 15) und Wildtypen (n = 9) wurden für 7 bis 16 Tage einem Temperaturwechsel ausgesetzt. Der Temperaturunterschied betrug 2°C (20,2°C ± 0,5°C / 22,2°C ± 0,5°C).

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die synchronisierten und nicht synchronisierten Fliegen beider Stämme.

Tabelle 8

Prozentualer Anteil von auf einen Temperaturwechsel synchronisierten und nicht synchronisierten Fliegen bei WT_B und **sol;so**

	n	synchronisiert	nicht synchronisiert	Zweifelsfälle
WT_B	9	55,6 %	11,1 %	33,3 %
sol;so	15	40,0 %	33,3 %	26,7 %

Synchronisierte Fliegen

WT_B: Die Fliegen waren in der "Warmperiode" des Temperaturwechsels aktiv, jedoch war die Abgrenzung zur "Kaltperiode" nicht so deutlich wie beim LD. Oft waren die Fliegen über die Warmperiode hinaus aktiv. (Sie begannen mit vermehrter Aktivität, bevor die Temperaturerhöhung erfolgte, und waren auch nach der Temperaturabsenkung noch sehr aktiv.)
Auch während der Kaltperiode trat noch Aktivität auf.
Bimodalität wurde nie beobachtet.
Ob die Synchronisation sofort nach Einsetzen des Temperaturzyklus erfolgte, kann nicht gesagt werden, da alle synchronisierten Tiere vorher bereits in Phase mit dem Temperaturzyklus waren.

sol;so: Die Synchronisation war sehr verschwommen, und es kann nicht ausgeschlossen werden, daß im Aktivitätsmuster unterschwellig noch freilaufende Komponenten vorhanden sind (Abb. 14a).
Die Aktivität trat nicht in der "Warmperiode" auf, sondern war nach hinten verschoben: In zwei Fällen soweit, daß die Tiere ihre Hauptaktivität in der Kaltperiode hatten.
Die anderen hatten sie am Ende der Warmperiode bis weit in die Kaltperiode hinein. Damit lag ihre Phase zum Temperaturabfall etwa so, wie die der Licht-aus-Komponente der durch LD synchronisierten Fliegen zum Licht-aus (Abb. 14).

Es bestanden jedoch mehrere Unterschiede:

- nie war eine biphasische Aktivität zu beobachten,
- das Aktivitätsband im Temperaturwechsel war wesentlich breiter als im LD,
- die Fliegen waren nicht unmittelbar synchronisiert, sondern brauchten 5 bis 10 Tage zur Synchronisation, je nach vorheriger Phasenlage.

Abb. 14 a, b (siehe nächste Seite):
Synchronisation von **sol;so** durch einen Temperaturzyklus (T↑↓) und durch einen Licht-Dunkel-Wechsel (LD; 300 lux). Warmperiode des T↑↓ und Lichtperiode des LD sind durch weiße Balken gekennzeichnet. Im T↑↓ sind andeutungsweise noch freilaufende Komponenten zu erkennen.

Abb. 15 a, b (siehe übernächste Seite):
Fliegen, die durch einen Temperaturwechsel (T↑↓) nicht synchronisiert wurden, aber im LD (300 lux) deutliche Synchronisation zeigen.

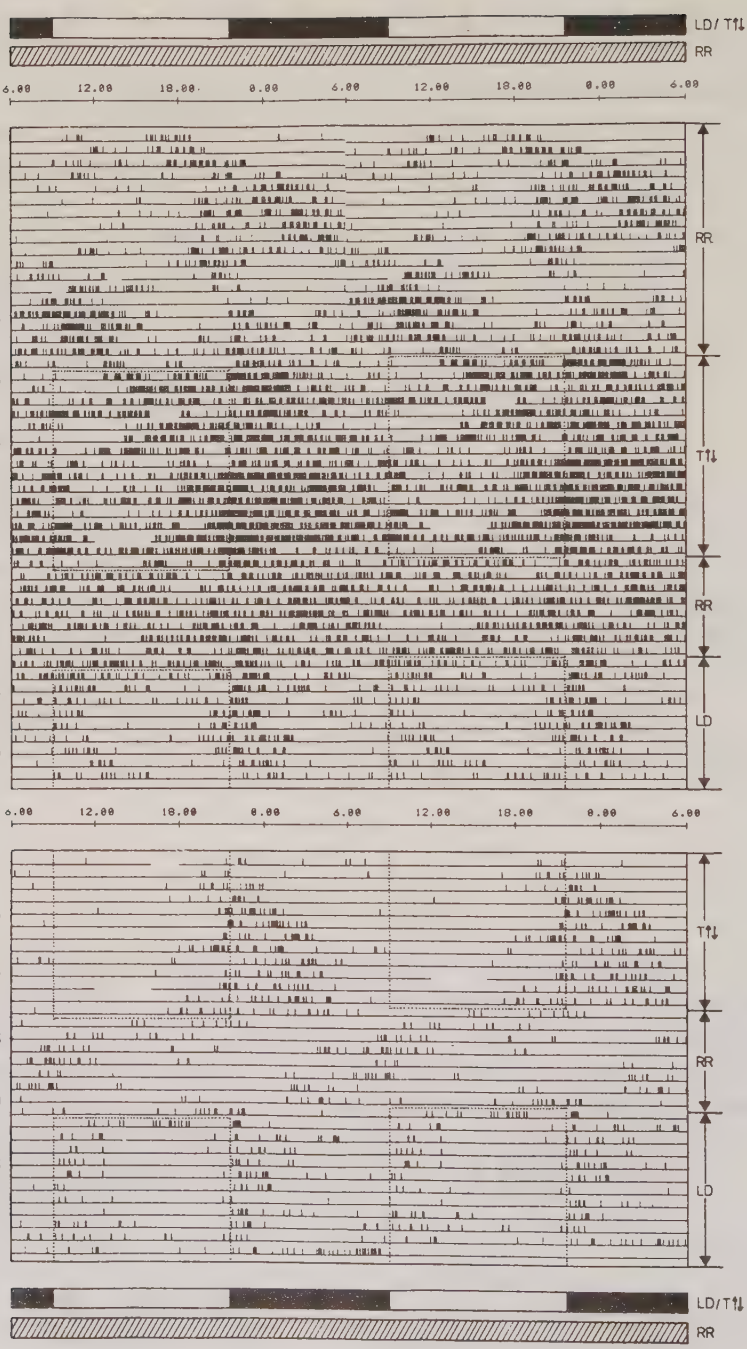


Abb. 14 (Legende siehe S. 43).

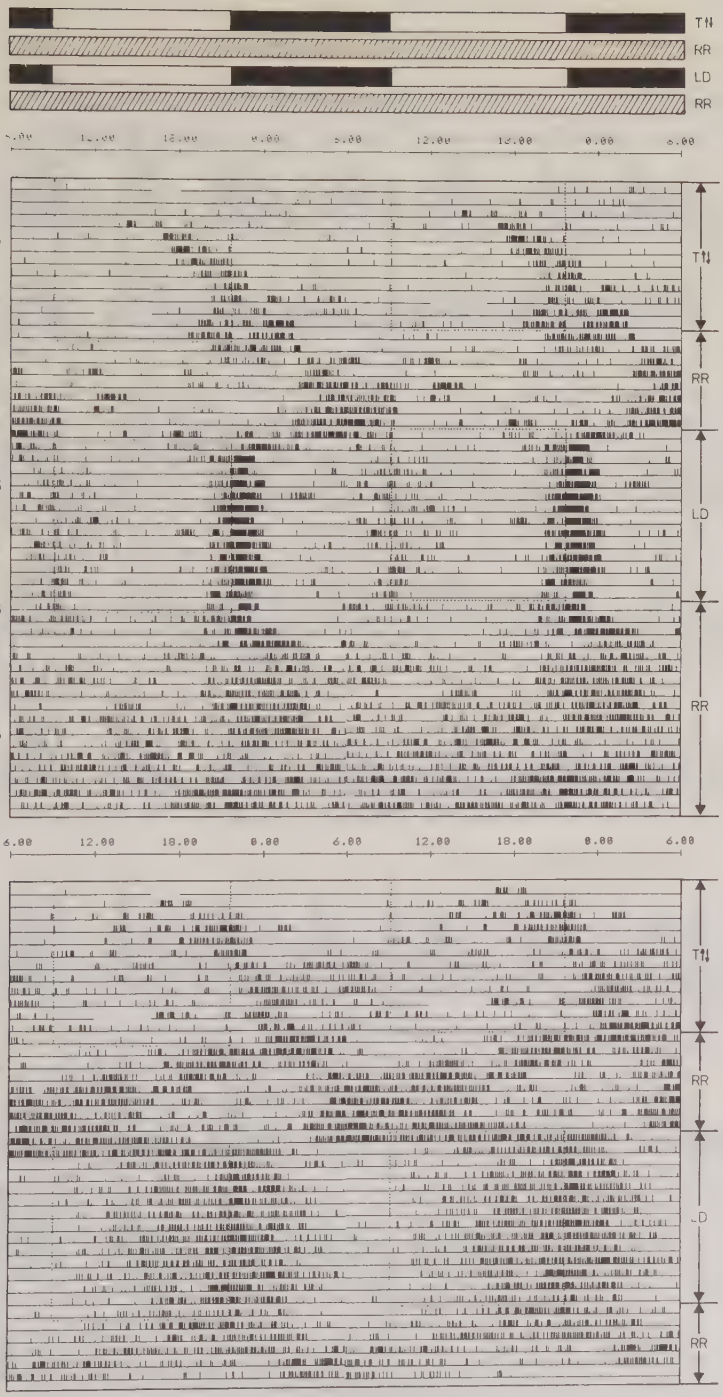


Abb. 15 (Legende siehe S. 43).

Nicht synchronisierte Fliegen und unklare Fälle:

WT_B: Bis auf eine Fliege lebten diese Fliegen nur 7 bis 10 Tage. Aufzeichnungen der Aktivität vor den Temperaturwechsel lagen nur bei einer Fliege vor. Diese war mit dem Temperaturwechsel stark außer Phase.

sol;so: Abb. 15 zeigt zwei Beispiele für Fliegen, die zwar im LD synchronisiert waren, im Temperaturwechsel aber Freilauf zeigten. Viele der nicht synchronisierten Fliegen hatten vor dem Temperaturwechsel eine ungünstige Phasenlage. Sie glichen diese dann allmählich an und hatten ihre typische Phasenlage zum Temperaturwechsel gegen Ende desselben gerade erreicht (vgl. Abb. 15 a). In diesen Fällen war es schwer zu beurteilen, ob sie synchronisert waren oder nicht.
Andere Fliegen waren während des Temperaturwechsels fast inaktiv oder hyperaktiv, so daß aus diesen Gründen eine Beurteilung schwer fiel.

8.2.2. Schlüpfrhythmik

Die Schlüpfrhythmikergebnisse für die verschiedenen Mutanten wurden aus mehreren Einzelversuchen gewonnen. Alle wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt und deshalb die aus den einzelnen Versuchen gewonnenen Schlüpfkurven jeweils für jeden Stamm aufaddiert. Abb. 16 zeigt die normalisierten Summenkurven für alle Stämme. Nur bei per^0 wurden die Absolutwerte eingetragen, da keine Schlüpfmaxima bestimmt werden konnten.

Bei so und den Doppelmutanten war das Vorhandensein der Schlüpfrhythmik ganz unabhängig von der Größe der Augenreste. Völlig augenlose Tiere schlüpften genauso rhythmisch wie solche mit Augenresten. Auch in der Periodenlänge war kein Unterschied zu sehen. Deshalb wurden diese Mutanten später ebenfalls automatisch registriert. (In Abb. 16 ist die Summe aus augenlosen Fliegen und solchen mit Augenresten eingetragen.)

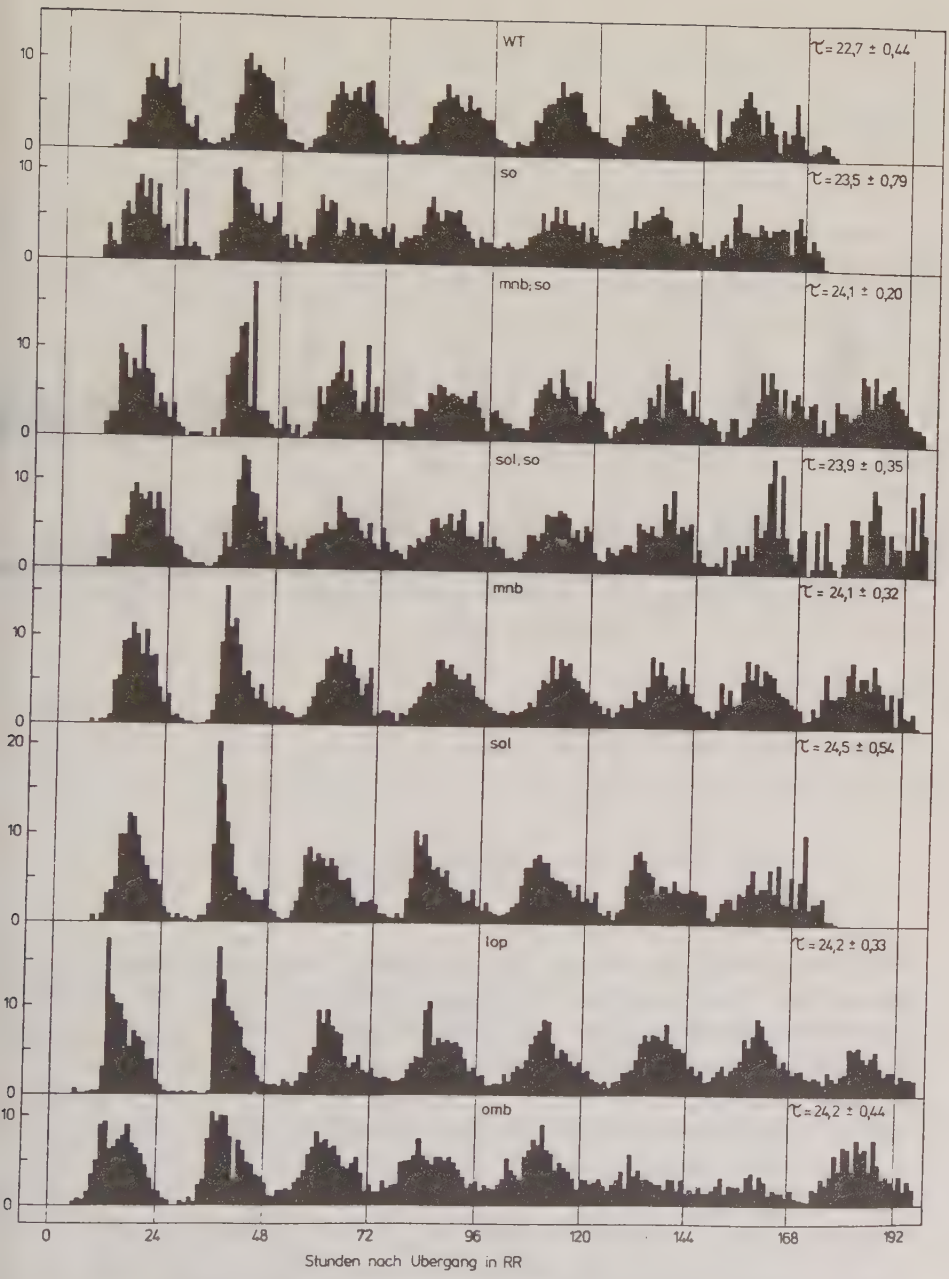


Abb. 16: Schlüpfrhythmik des Wildstamms und der verschiedenen Mutanten (normalisierte Kurven). Am rechten Rand ist jeweils die Periodenlänge angegeben.

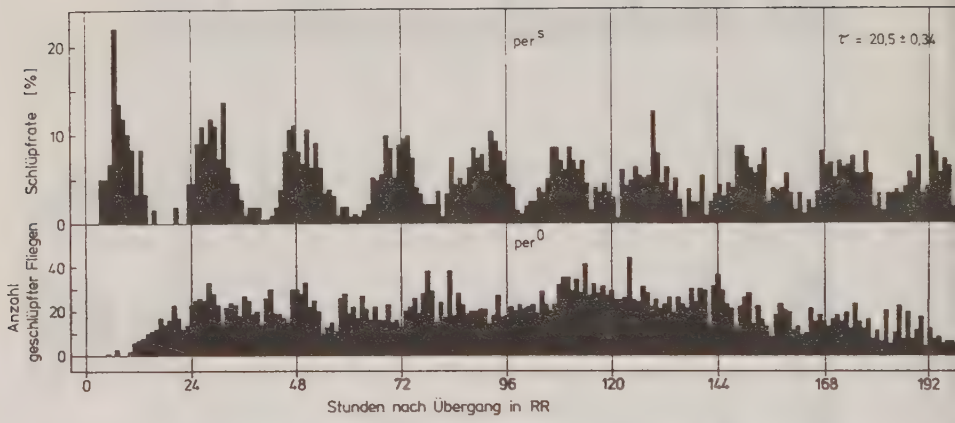


Abb. 16 (Fortsetzung):
Schlüpfrhythmik der per-Mutanten. Bei per^0 ist die Kurve nicht normalisiert.

Tabelle 9 gibt die Anzahl der Versuche, die Gesamtzahl der geschlüpften Tiere und die errechneten Periodenlängen für die verschiedenen Stämme wieder. Zum Vergleich sind die Periodenlängen der Laufaktivitätsrhythmik miteingetragen.

Tabelle 9

Anzahl der Schlüpfrhythmikversuche (x), Zahl der insgesamt geschlüpften Tiere (n) und Periodenlängen der verschiedenen Stämme für Schlüpf- und Laufaktivitätsrhythmik.

	x	n	Schlüpfrhythmik	Laufaktivitätsrhythmik
WTB	5	10 197	22,7 ± 0,44 *	23,6 ± 0,05
omb	4	7 031	24,2 ± 0,44	23,5 ± 0,09
lop	2	17 506	24,2 ± 0,33	23,6 ± 0,07
mnb	5	5 331	24,1 ± 0,32	23,5 ± 0,07
sol	5	7 019	24,5 ± 0,54	23.7 ± 0,05
so	7	4 898	23,5 ± 0,79	24,1 ± 0,05
mnb;so	5	2 164	24,1 ± 0,20	21,4 ± 0,18 25,1 ± 0,08
sol;so	8	3 054	23,9 ± 0,35	21,4 ± 0,14 25,5 ± 0,09
per^s	1	2 450	20,5 ± 0,34 *	19,6 ± 0,11
per^0	1		-	-

* im Vergleich zu den übrigen Stämmen signifikant kürzer bei $\alpha = 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test)

Auffallend ist die relativ geringe Schlüpfausbeute bei so, mnb und besonders bei den Doppelmutanten. Auszählungen ergaben, daß bei den Doppelmutanten nur etwa 30 % der verpuppten Fliegen schlüpften. Die übrigen entwickelten sich zwar normal, waren aber anscheinend unfähig, aus der Puppenhülle zu kommen ur· ertrockneten schließlich. Künstlich aus der Puppe befreite Fliegen überlebten und unterschieden sich nicht von normal geschlüpften.

Die Periodenlänge von per^s war signifikant kürzer als die aller anderen Stämme, bei per^0 war keine Rhythmik zu erkennen.

WT_B hatte ebenfalls eine signifikant kürzere Periodenlänge als die übrigen Gehirnmutanten. Deren Periodenlängen lagen alle dicht bei 24 Stunden und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Mit Ausnahme von per^s wurde keine Korrelation zwischen den Periodenlängen von Schlüpf- und Laufaktivitätsrhythmik gefunden.

B.2.3. Neurosekretorische Zellen

B.2.3.1. Allgemeine Beobachtungen

Die Anfärbung der neurosekretorischen Zellen mit Paraldehydfuchsin war bei den gewählten Färbebedingungen nur bei älteren Fliegen möglich:

Bei sehr jungen Fliegen (weniger als 7 Tage alt) färbten sich die neurosekretorischen Zellen nicht, bei mittelalten (~14 Tage) waren die Zellen der Pars intercerebralis angefärbt und erst bei älteren (>20 Tage) färbten sich auch die lateralen neurosekretorischen Zellgruppen an. Die Färbung war um so deutlicher, je älter die Fliegen waren.

Sehr störend wirkten sich Reste vom Fettkörper und von größeren Tracheen auf das Färbeergebnis aus. Der Fettkörper mußte deshalb vollständig entfernt werden. Das brachte einige Schwierigkeiten mit sich, da er teilweise sehr fest am Perilemm des Gehirns saß. Bei Beschädigung des Perilemms wurden die neurosekretorischen Zellen oft verschoben, da sie sehr nahe an der Oberfläche des Gehirns sitzen. Selbst eine leichte Quetschung des Gehirns konnte dies bewirken. Aus diesem Grund wurden nur Gehirne in Betracht gezogen, deren äußere Form vor der Färbung und Fixierung in keiner Weise verändert war. Leichte Schrumpfungen während der Fixierung mußten in Kauf genommen werden.

B.2.3.2. Beschreibung der gefundenen neurosekretorischen Zellgruppen beim Wildtyp

Es wurden vier Gruppen von neurosekretorischen Zellen gefunden. Eine Unterscheidung zwischen Zellen vom Typ A und Typ B war nicht möglich.
Die größte neurosekretorische Zellgruppe war die der Pars intercerebralis. Es wurden 20 bis 32 angefärbte Zellen gezählt.
Kleinere neurosekretorische Zellgruppen befanden sich auf der "Hinterseite des Gehirns. Sehr gut zu sehen waren fast immer zwei Paar Zellen nahe den Calyces der Pilzkörper (Abb. 17 c).
Auf der Frontseite des Gehirns gab es ebenfalls eine paarig vorhandene Zellgruppe. Sie bestand aus zwei bis vier Zellen und lag genau zwischen Protocerebrum und den optischen Ganglien (Abb. 17 b).

B.2.3.3. Neurosekretorische Zellgrupppen bei den Mutanten

In Bezug auf ihre neurosekretorischen Zellen unterschieden sich die Mutanten in keiner Weise vom Wildtyp: Zahl und Lage der Zellen war gleich. Auch die neurosekretorischen Zellen zwischen Protocerebrum und optischen Ganglien waren bei **so** (Abb. 18) und **sol;so** bzw. **mnb;so** (Abb. 19) vorhanden.

Abb. 20 gibt einen Überblick über die gefundenen neurosekretorischen Zellen bei Wildtyp und Mutanten.

Abb. 17 (siehe nächste Seite): Neurosekretorische Zellen beim **WT**.

a) Übersicht über das Gehirn bei stark abgeblendetem Mikroskopkondensor (⟶ große Tiefenschärfe).
b), c) Gleiches Gehirn, auf die Vorderfront (b) bzw. Hinterfront (c) scharf gestellt.
Die Pfeile kennzeichnen die neurosekretorischen Zellen.

Abb. 17 (Legende siehe S. 51).

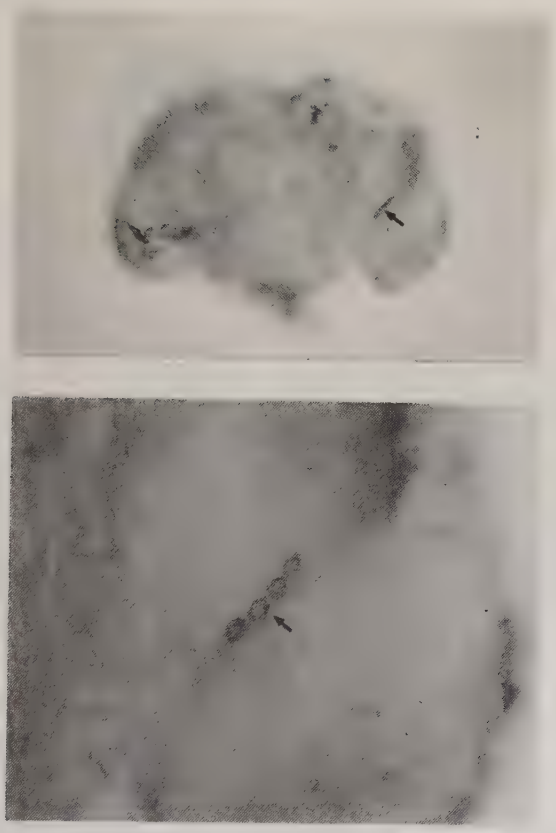


Abb. 18: Neurosekretorische Zellen zwischen Zentralgehirn und optischen Ganglien bei so.

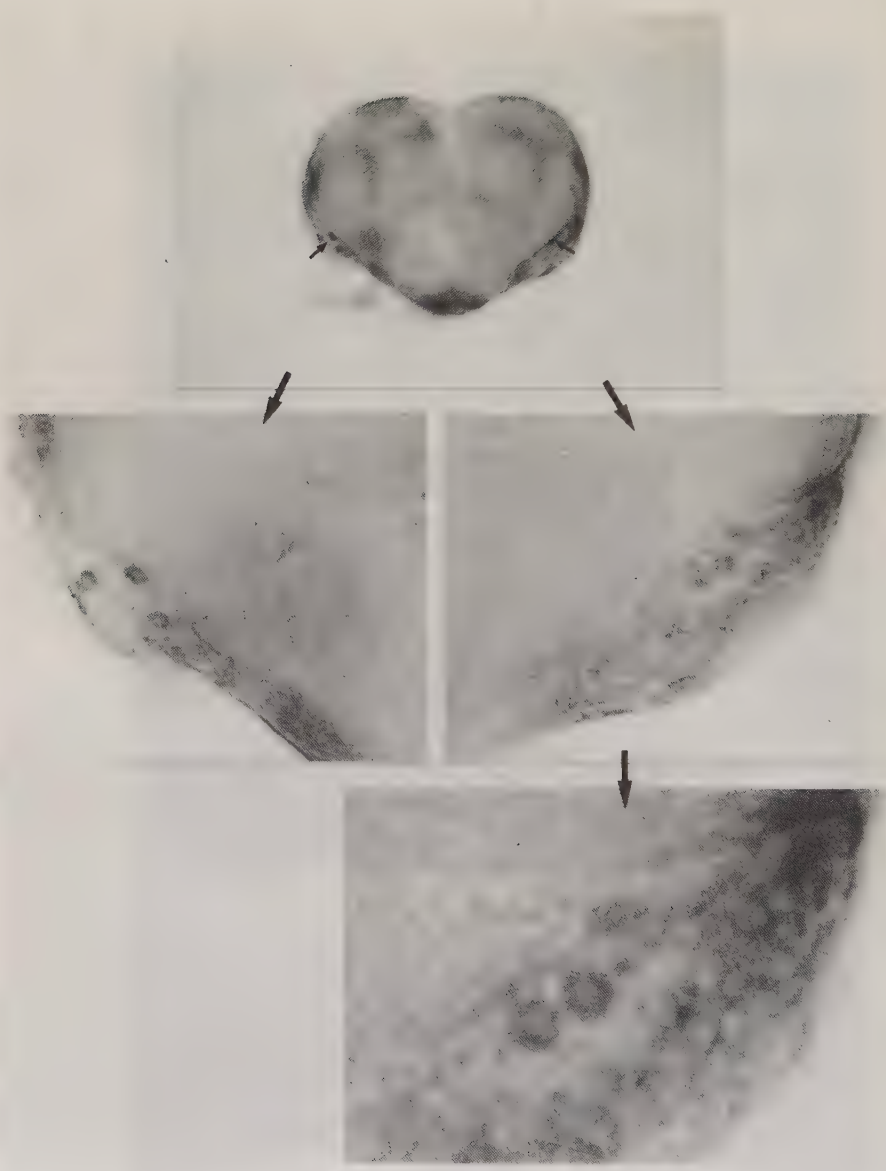


Abb. 19: Neurosekretorische Zellen zwischen Zentralgehirn und optischen Ganglien bei sol;so.

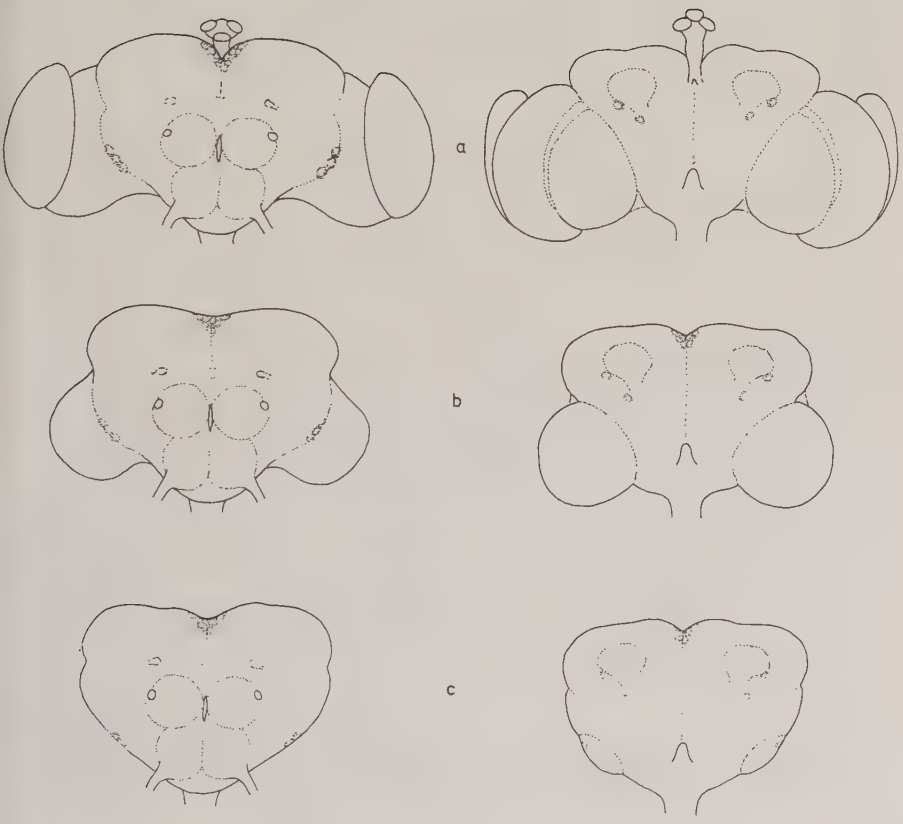


Abb. 20: Übersicht über die neurosekretorischen Zellen beim Wildtyp (a) und den Mutanten so (b) und sol;so (bzw. mnb;so) (c). Rechts: Frontalansicht; links: Dorsalansicht.

B.3 Diskussion

B.3.1. Bedeutung der optischen Ganglien für die Laufaktivitäts-rhythmik von DROSOPHILA MELANOGASTER

Bei keiner der untersuchten Gehirnmutanten ist der Anteil arrhythmischer Fliegen signifikant erhöht. Deshalb besteht kein Grund zur Annahme, daß bei einer von ihnen das circadiane System verloren gegangen ist.

Addiert man die Auswirkungen aller Mutationen, so zeigt sich, daß es nur sehr wenige Neuronen in den optischen Ganglien gibt, die von keiner Mutation betroffen sind:

1) **so** hat keine Lamina. ⟶ Die Lamina scheidet als Sitz für Pacemaker aus.

2) **lop** und **omb** fehlen verschiedene Neuronengruppen in der Lobulaplatte. Bei linearer Addition beider Mutationen würde von der Lobulaplatte nichts mehr übrig bleiben (Fischbach, persönliche Mitteilung). ⟶ Die Lobulaplatte scheidet aus.

3) **sol** und **mnb** sind im Ausmaß der Reduktion der optischen Ganglien zwar vergleichbar, aber von beiden Mutationen sind unterschiedliche Neuronenklassen betroffen (Heidenreich, 1982). Folglich sind die Rudimente der optischen Ganglien bei **sol;so** und **mnb;so** wahrscheinlich aus verschiedenen Neuronenstrukturen zusammengesetzt.

4) Die einzigen bisher sicheren gemeinsamen Strukturen von **so** und **sol** (bzw. **mnb**) sind die großen Tangentialneuronen der Medulla und des Lobulakomplexes (Fischbach, persönliche Mitteilung).

5) Bei den Doppelmutanten konnten bisher lediglich die Riesenneuronen der Lobulaplatte (= große Tangentialneuronen) sicher identifiziert werden. Genau diese Neuronen fehlen jedoch **omb**.

Insgesamt sind die Tangentialneuronen der Medulla und der Lobula die einzigen Neuronen, die eventuell bei allen Mutanten vorhanden sein könnten. Allerdings konnten sie bei den Doppelmutanten bisher nicht nachgewiesen werden.

Damit werden die optischen Ganglien als alleiniger Sitz von Pacemakern für die Laufaktivitätsrhythmik höchst unwahrscheinlich.

Die optischen Ganglien scheinen für die Ausprägung der Aktivitätsrhythmik jedoch Bedeutung zu haben. Dafür spricht der signifikant erhöhte Anteil von Fliegen mit zwei oder mehr circadianen Komponenten bei den Doppelmutanten. Des weitern spricht die signifikante Verlängerung der Periodenlänge bei so und sol;so (bzw. mnb;so) für eine Beteiligung der optischen Ganglien am circadianen System.
Da die Rhythmik mit zunehmender Verkleinerung des Volumens der optischen Ganglien komplexer und die Periodenlänge länger wird (Reihe: $WT_B \longrightarrow$ so $\longrightarrow$ sol;so (bzw. mnb;so)), scheint eher die Summe von intakten Neuronen, als ein eng begrenzter Neuronenbereich für das Aufrechterhalten einer normalen Rhythmik und Periodenlänge verantwortlich zu sein. Daß so etwas möglich ist, zeigten Versuche am isolierten Auge von Aplysia: Geweberedukti0nen verkürzten die Freilaufperiodenlänge des "compound action potential" (CAP), und bei Reduktion des Gewebes um 80 % war die bleibende Aktivität im optischen Nerven arrhythmisch (Jacklet und Geronimo, 1971). Daraus wurde geschlossen, daß der CAP-Rhythmus von einer Population von gegenseitig gekoppelten Oszillatoren mit hochfrequenter nicht circadianer Frequenz erzeugt wird. Diese Erklärung beruht auf einem Modell von Pavlidis (1969), bei dem circadiane Pacemaker als eine Population von biochemischen Oszillatoren erklärt werden. Die Frequenz hängt dabei von der Anzahl der Einzeloszillatoren ab.

Andererseits könnten die optischen Ganglien als Kopplungsfaktor für verschiedene im Zentralgehirn lokalisierte Laufaktivitätsoszillatoren wirken. Eine Verringerung der Kopplungsstärke würde zunächst eine Periodenverlängerung bewirken und im Extremfall zum Entkoppeln verschiedener Komponenten führen.

Beide Hypothesen setzen voraus, daß die Laufaktivitätsrhythmik bei DROSOPHILA ganz allgemein von mehreren Oszillatoren (evtl. zwei Oszillatorengruppen) gesteuert wird. Die Tatsache, daß auch der Wildtyp manchmal zwei oder mehrere Rhythmen nebeneinander zeigt (vgl. Helfrich und Engelmann, 1983) unterstützt diese Hypothese.

8.3.2. Mögliche Erklärung der Arrhythmie bei per^0

Auf vielen der Aktogramme von per^0 ist zumindest zeitweise noch eine Rhythmik zu erkennen. Dies macht deutlich, daß Arrhythmie nicht unbedingt mit einem Fehlen der "inneren Uhr" (bzw. der "inneren Uhren") gleichzusetzen ist.
Oftmals läßt sich die Arrhythmie genausogut durch ein Auseinanderlaufen (asynchron werden oder entkoppeln) von mehreren Einzeloszillatoren erklären. Dafür spricht auch die Tatsache, daß sich per^0 durch einen LD synchronisieren läßt und daß nach Ende des LD viele Fliegen für wenige Tage rhythmisch bleiben und erst allmählich wieder in Arrhythmie übergehen. Dies würde bedeuten, daß der äußere Zeitgeber (hier der LD) stark genug ist, um die Einzeloszillatoren zu synchronisieren, die innere Kopplung zwischen den Einzeloszillatoren jedoch alleine nicht ausreicht, um ihre interne Synchronisation aufrechtzuerhalten, weshalb sie unter Konstantbedingungen mehr oder weniger schnell wieder auseinander laufen.
Untersuchungen an Speicheldrüsen von per^0 (Weitzel und Rensing, 1981) zeigten, daß die Einzelzellen der Drüse noch rhythmisch waren, die Drüse als Ganzes jedoch kaum noch Rhythmizität zeigte. Dies könnte ebenfalls auf ein asynchrones Schwingen der Einzelzellen zurückzuführen sein.

Die Arrhythmie von per^0 wie auch die Periodenlängenveränderung von per^s und per^l konnte auf Veränderungen innerhalb einer spezifischen Region auf dem X-Chromosom zurückgeführt werden (Young und Judd, 1978; Bargiello und Young, 1984). Kürzlich gelang es sogar durch Transfer eines 7,1 kb DNA-Stücks, welches für eine 4,5 kb poly $(A)^+$ RNA kodiert, eine arrhythmische Mutante wieder rhythmisch zu machen (Bargiello, Jackson und Young, 1984). Das von dieser 4,5 kb poly $(A)^+$ RNA translatierte Protein scheint große Bedeutung für die physiologische Uhr zu haben. So ist es in der Lage, abhängig von seiner Dosis oder Wirksamkeit, die Periodenlänge zu beschleunigen oder zu verlangsamen (Smith und Konopka, 1982). Fehlt es ganz oder ist es inaktiv, wie für per^0 angenommen wird, so können die Tiere keine Rhythmik mehr aufrechterhalten.

Dieser Befund impliziert jedoch nicht, daß per^0 keine innere Uhr mehr hat, sondern lediglich, daß der Mutante ein essentieller

Stoff zum normalen Funktionieren der Uhr fehlt. Geht man nun davon aus, daß die innere Uhr aus vielen Einzeloszillatoren besteht, so könnte dieses Protein in der Lage sein die Kopplung zwischen den Einzeloszillatoren oder die Stärke der Einzeloszillatoren selbst zu verändern. Beides verändert wiederum die Periodenlänge (Enright, 1980).
Bei DROSOPHILA würde beispielsweise eine starke Kopplung, hervorgerufen durch eine große Menge oder sehr aktives Protein, eine kurze Periodenlänge bewirken. Bei herabgesetzter Kopplung durch weniger aktives Protein würde sich die Periodenlänge verlängern und bei noch schwächerer Kopplung in Arrhythmie übergehen. In der Tat wurde eine Mutante gefunden (T(1;4)JC43), die entweder eine sehr lange Periodenlänge hat oder arrhythmisch ist, oder aber im Laufe ihres Lebens von einer sehr langen Periodenlänge in Arrhythmie übergeht (Smith und Konopka, 1981).

Es erscheint unwahrscheinlich, daß durch Reduktion von Gewebe in den optischen Ganglien die Konzentration des fraglichen Proteins herabgesetzt wird. Sowohl die optischen Ganglien alsauch das Protein könnten jedoch die Kopplung zwischen Einzeloszillatoren beeinflussen.

B.3.3. Verhalten der blinden Fliegen im LD und Vergleich mit dem Wildtyp

Erstaunlicherweise ließen sich die blinden Doppelmutanten durch LD-Zyklen bis zur Lichtintensität von 1 lux synchronisieren. Die Synchronisation erfolgte ohne nennenswerte Transients, und die Fliegen folgten auch Phasenverschiebungen des LD sofort.

Dies deutet auf einen sehr lichtempfindlichen extraocularen Fotorezeptor für die Laufaktivitätsrhythmik hin, denn den Doppelmutanten fehlen sowohl Komplexaugen als auch Ocellen.

Eine Synchronisation durch bei Lichteinfall entstehende Absorptionswärme auf der Cuticula kann wegen der geringen Lichtintensität weitgehend ausgeschlossen werden. Um ganz sicher zu gehen, wurden in einem weiteren Versuch Temperaturzyklen mit 2°C Tempe-

raturunterschied angeboten. Es ist nicht anzunehmen, daß die eventuell durch Lichtabsorption entstandene Wärme bei den verwendeten Lichtintensitäten 2°C betrug, insbesondere nicht, da die Cuticula von DROSOPHILA nicht schwarz ist.
Bei diesem Temperaturunterschied ließen sich jedoch nur 50 % der Fliegen synchronisieren. Sie brauchten zur Synchronisation fünf bis zehn Tage und hatten ein undeutlicheres Synchronisationsmuster als im LD.

Demnach ist die im LD beobachtete Synchronisation auf das Licht und nicht auf die Temperatur zurückzuführen.

Extraoculare Fotorezeptoren sind bei Invertebraten sehr häufig (Truman, 1976; Page, 1982 b).
So ist bei DROSOPHILA schon länger bekannt, daß die Komplexaugen (und Ocellen) für die Synchronisation der Schlüpfrhythmik keine Rolle spielen (Zimmermann und Ives, 1971; Zimmermann und Goldsmith, 1971; Engelmann und Honnegger, 1966).

Der erste Hinweis, daß Komplexaugen und Ocellen auch für die Synchronisation der Laufaktivitätsrhythmik unbedeutend sind, war die Fähigkeit der augenlosen Mutante so, sich auf einen LD (12:12) zu synchronisieren (Helfrich und Engelmann, 1983).
Merkwürdigerweise war ihr Aktivitätsmuster im LD jedoch verschieden von dem der Doppelmutanten. so zeigte wie der Wildtyp im LD einen Morgen- und Abendgipfel der Laufaktivität. Ein solches bimodales Muster wurde bereits von anderen Autoren für die Rhythmik der Laufaktivität und des Sauerstoffverbrauchs bei DROSOPHILA beschrieben (Hardeland und Stange, 1971; Mack, 1980; Rensing 1966 b; Rensing et al., 1968).

Die Doppelmutanten haben in Unabhängigkeit von der Lichtintensität entweder beide Gipfel (L-an- und L-aus-Komponente) oder nur den Abendgipfel (L-aus-Komponente).
Beide Gipfel haben jedoch eine veränderte Phasenbeziehung zu L-an und L-aus. Der Morgengipfel beginnt deutlich vor L-an und der Abendgipfel erstreckt sich in die Dunkelperiode hinein.

Dieser Unterschied zu so kann nur auf die weitere Verkleinerung

der optischen Ganglien bei den Doppelmutanten zurückgeführt werden, denn Komplexaugen und Ocellen fehlen in beiden Fällen.

Es gibt zwei mögliche Erklärungen:

Entweder können die optischen Ganglien selbst Licht wahrnehmen und zur Synchronisation beitragen. Oder das circadiane System ist durch die Verkleinerung der optischen Ganglien verändert, und diese Veränderung wirkt sich auch auf das Synchronisationsverhalten aus.

Eine Lichtempfindlichkeit der optischen Ganglien ist schwer vorstellbar, da dazu absorbierende Pigmente vorhanden sein müssten, solche aber bisher dort nicht nachgewiesen wurden.

Für die zweite Erklärung spricht, daß die wenigen durch Temperaturzyklen deutlich synchronisierten Fliegen zum Temperaturzyklus die gleiche, veränderte Phasenbeziehung haben wie zum LD bei 40 lux. Der Wildtyp zeigt dagegen im LD und im Temperaturwechsel die normale Phasenbeziehung. Bei so wurde das Aktivitätsmuster leider nicht im Temperaturwechsel aufgezeichnet.

Nach den Regeln der Schwingungslehre ist die Phasenbeziehung einer Schwingung zu einem festen äußeren Zeitgeber (hier T = 24 Std.) abhängig von der Eigenfrequenz der Schwingung und der Stärke des Zeitgebers.
Nimmt man nun einen LD (12:12) als äußeren Zeitgeber und die Laufaktivität eines tagaktiven Tiers als Zeiger für eine endogene Rhythmik mit der Periodenlänge τ, so wird sich die Aktivität ans Ende der Lichtperiode schieben, wenn τ sehr lang ist und an den Anfang der Lichtperiode, wenn τ sehr kurz ist.
Bei den Doppelmutanten findet man beides, und dies ist auch zu erwarten, da im Freilauf zwei Komponenten auftreten: eine mit einem τ von 22 Std. und die andere mit einem τ von 25 Std.
Danach könnte die veränderte Phasenbeziehung zum LD auf die im Freilauf beobachteten extremen Periodenlängen zurückgeführt werden. Ist diese Hypothese richtig, so müßten die Phasenwinkel zwischen Aktivität und L-an (bzw. L-aus) bei Herabsenken der Lichtintensität noch größer werden und im anschließenden RR vom Morgengipfel die Komponente mit kurzer Periodenlänge und vom

Abendgipfel die mit langer Periodenlänge ausgehen.

Keine dieser Voraussetzungen wurde jedoch erfüllt:

- Bei Herabsetzen der Lichtintensität von 300 lux auf 40 lux schien die L-an-Komponente mit der L-aus-Komponente zu einem verbreiterten Abendgipfel zu verschmelzen: Der Morgengipfel verschwand und der Abendgipfel begann etwas früher und wurde breiter. Die Durchschnittsaktivität blieb etwa gleich.

- Sich dem LD anschließende Aufzeichnungen im RR zeigten nur in einem Fall, daß eine Komponente mit kurzer Periodenlänge von L-an ausgehend weiterlief. In allen anderen Fällen verschwand der Morgengipfel nach wenigen Tagen, und vom Abendgipfel spalteten sich beide Komponenten ab, die mit langer und die mit kurzer Periodenlänge.

Damit scheinen Morgen- und Abendgipfel des LD nicht mit den beiden im Freilauf beobachteten Komponenten identisch zu sein.

Trotz des Verschwindens der L-an-Komponente bei niedrigen Lichtintensitäten und im RR handelt es sich bei ihr wahrscheinlich nicht um eine exogene Reaktion auf L-an (Maskiereffekt des Lichts). Ansonsten müßte sie mit Ende des LD schlagartig verschwinden und sie dürfte im LD erst genau bei L-an beginnen und nicht schon deutlich vorher. Die L-an-Komponente scheint vielmehr ein Teil des Oszillatorsystems zu sein, dessen Auftreten von der Lichtintensität abhängig ist. Bei niedriger Lichtintensität formen L-an- und L-aus-Komponente einen gemeinsamen Abendgipfel in der Laufaktivität.

Wie schon erwähnt, findet man die L-an- und L-aus-Komponente auch im bimodalen Aktivitätsmuster des Wildtyps, lediglich in anderer Phasenlage zum LD.
Auch beim Wildtyp scheint die L-an-Komponente nicht rein exogen zu sein, obwohl sie stets genau mit L-an beginnt. Sie setzt sich im RR fort: teils parallel zur L-aus-Komponente, teils gegenläufig zu ihr, teils splittet sie in eine lange und kurze Komponente auf.

Diese Beobachtungen deuten wiederum darauf hin, daß sich die

Mutanten mit stark verkleinerten optischen Ganglien im prinzipiellen Aufbau des Oszillatorsystems nicht vom WT unterscheiden.

B.3.4. Schlüpfrhythmik

Das circadiane Muster der Schlüpfrhythmik scheint bei allen Mutanten unverändert zu sein. Die optischen Ganglien sind also offensichtlich nicht in die Kontrolle der Schlüpfrhythmik verwikkelt.
Mit Ausnahme der pers-Mutante gibt es keine Korrelation zwischen der Periodenlänge der Schlüpf- und Laufaktivitätsrhythmik für die verschiedenen Mutanten. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß beide Rhythmen von verschiedenen Oszillatoren (bzw. Oszillatorpopulationen) gesteuert werden (vgl. Engelmann und Mack, 1978) und die Reduktion der optischen Ganglien nur auf die Laufaktivitätsrhythmik wirkt. Das durch die per-Mutationen veränderte Protein könnte dagegen allgemein auf die Kopplung zwischen Einzeloszillatoren aller Oszillatorpopulationen wirken.

Allerdings muß daraufhingewiesen werden, daß eine ganz genaue Periodenlängenbestimmung bei der Schlüpfrhythmik problematisch ist. Es wurde eine große Variation in den Abständen zwischen den einzelnen Schlüpfmaxima eines Versuches und auch in der Periodenlänge zwischen verschiedenen Versuchen gefunden. Diese Ungenauigkeiten sind unter anderem auf den kurzen Zeitraum zurückzuführen, in dem die Schlüpfrhythmik gemessen werden kann. Dazu kommen wie bei jeder Populationsrhythmik die individuellen Unterschiede zwischen den Einzeltieren. So erscheint es fraglich, ob eine eventuelle Aufspaltung in zwei Rhythmen bei den Doppelmutanten innerhalb von nur acht Zyklen erkennbar sein kann. Jedoch müßte die Rhythmik zumindest schneller ausdämpfen, falls interindividuelle Unterschiede in τ von zwei bis drei Stunden aufträten. Da dies jedoch nicht beobachtet wurde, ist anzunehmen, daß Schlüpf- und Laufaktivitätsrhythmik voneinander unabhängig gesteuert werden. Ähnliches gilt auch für CALLIPHORA STYGIA. Hier verkürzt sich τ der Schlüpfrhythmik bei zunehmender Lichtintensität, während sich τ für die Laufaktivitätsrhythmikverlängert(Waddel, 1984).

Der bei so, mnb und den Doppelmutanten beobachtete Schlüpfdefekt wurde bereits von Heidenreich (1980) beschrieben und auf mangelnde Beinbewegungen beim Schlüpfvorgang zurückgeführt.

Erstaunlich und nicht erklärbar ist die sehr kurze Periodenlänge des Wildtyps. Normalerweise liegt τ für die Schlüpfrhythmik nahe bei 24 Std. (Mack, 1980). Da jedoch sechs Einzelversuche mit jeweils demselben Ergebnis gemacht wurden, erscheint es unwahrscheinlich, daß das gefunden kurze τ ein Zufallsergebnis ist.

8.3.5. Neurosekretorische Zellen

Die Ergebnisse, die mit der Paraldehydfuchsinfärbung erzielt wurden, stimmen recht gut mit früheren Befunden überein:

Die Anfärbbarkeit hängt vom Alter der Fliegen ab (Köpf, 1957; Thomsen, 1965) und eine Unterscheidung in A- und B-Zellen scheint bei der Paraldehydfärbung fraglich (Thomsen, 1965; Rensing, 1966a).

Die beschriebenen neurosekretorischen Zellgruppen entsprechen ganz gut den bereits für D. FUNEBRIS (Köpf, 1957) und D. MELANOGASTER (Rensing, 1966 a) beschriebenen Gruppen. Nur das von Rensing (1966 a) beschriebene Zellpaar in der Frontalregion vor dem mittleren Faserbündel wurde nicht gefunden. Allerdings färbte es sich bei ihm auch nur ab und zu an, und es ist deshalb nicht anzunehmen, daß es bei den hier untersuchten Fliegen fehlt.

Die Untersuchung der neurosekretorischen Zellen bei den Mutanten war insofern interessant, als Neurohormone Rhythmen vermitteln (Handler und Konopka, 1979) und ein Zusammenhang zwischen Zahl und Lage neurosekretorischer Zellen und Ausprägung der Rhythmik gefunden wurde (Konopka und Wells, 1980).
Die beobachteten Änderungen im Aktivitätsmuster der Doppelmutanten hätten also auch auf dem Fehlen neurosekretorischer Zellgruppen beruhen können. Dabei war insbesondere an die Zellgruppe zwischen Protocerebrum und optischen Ganglien zu denken, da unbekannt war, ob diese von der Mutation betroffen war.

Interessanterweise war das neurosekretorische System der Mutanten

völlig identisch mit dem des Wildtyps und auch die Anfärbbarkeit der Zellen in Bezug auf das Entwicklungsstadium unterschied sich nicht von ihm. Damit ist das veränderte Verhalten der Mutanten nicht auf fehlende neurosekretorische Zellen zurückzuführen.

Höchst fragwürdig erscheinen die Untersuchungen von Konopka und Wells (1980), die die Arrhythmie von per^0 auf eine geänderte Position der auf der Hinterseite des Gehirns gelegenen neurosekretorischen Zellen zurückführten.
Die Zellen könnten durch die Präparation verschoben worden sein. Die hier gemachten Untersuchungen zeigen, daß dies sehr leicht bei Verletzen des Perilemms oder Quetschen des ganzen Gehirns passieren kann. In der Tat zeigt das in einer Abbildung als Beispiel angeführte Gehirn aus Konopka und Wells (1980) eine abnorme äußere Form.

Der gelungene Nachweis der neurosekretorischen Zellen läßt noch keinerlei Aussage über ihre Funktionsfähigkeit und über eine eventuelle Beteiligung von neurosekretorischen Zellen am circadianen System der Fliegen zu. Eine genauere Untersuchung steht noch aus.

Es ist wahrscheinlich, daß Neurosekretion eine Rolle im circadianen System spielt:
Nach Beschädigung oder Entfernen der Pars intercerebralis verschwindet die Laufaktivitätsrhythmik bei Schaben (Roberts, 1966; Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1967) und Grillen (Cymborowski, 1973). Bei Schaben könnten hormonale Faktoren die Rhythmik von Tier zu Tier übertragen (Cymborowski und Brady, 1972); bei DROSOPHILA müssen Neurohormone für diese Übertragung verantwortlich sein (Handler und Konopka, 1979). Bei Grillen gelang die Übertragung der Rhythmik durch Transplantation der Pars intercerebralis (Cymborowski, 1981). Tagesrhythmische Schwankungen im Zellkernvolumen der neurosekretorischen Zellen der Pars intercerebralis wurden bei DROSOPHILA gemessen (Rensing, 1966 a). Das Zellkernvolumen ist ein indirektes Maß für die eigentliche Hormonsynthese (Klug, 1958/59: Bünning und Joerrens, 1962). Interessanterweise gab es eine hohe und steile Zunahme des Zellkernvolumens drei Stunden vor Beginn der Lichtperiode und eine niedrigere und breitere drei bis sechs Stunden vor Beginn der Dunkelzeit. Dieses Muster stimmt genau mit

dem Aktivitätsmuster der Doppelmutanten im LD überein, und die Frage erhebt sich, ob das Licht über die neurosekretorischen Zellen auf die Laufaktivität wirkt. Immerhin kann Licht als Zeitgeber direkt vom Gehirn oder den neurosekretorischen wahrgenommen werden (Kalmus, 1938; Gorf, 1963; Lees, 1964; Steel und Lees, 1977) und damit rückt dies in den Bereich des Möglichen. Endgültige Klärung kann jedoch nur durch weitere Versuche erzielt werden.

C. VERSUCHE MIT MUSCA DOMESTICA

C.1. Material und Methoden

C.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Stubenfliegen (MUSCA DOMESTICA). Sie stammten aus der Umgebung Tübingens und wurden seit einigen Jahren im LD 16:8 bei 25°C gezüchtet. Die Fliegen waren nicht älter als 10 Tage, als sie in den Versuch genommen wurden. Es wurden wiederum Tiere beiderlei Geschlechts verwendet.

C.1.2. Versuchsaufbau, Registrierung und Auswertung

Die Laufaktivität von MUSCA wurde mit der gleichen Anlage registriert wie die von DROSOPHILA. Lediglich die Versuchsschälchen waren größer: Sie hatten einen Durchmesser von 9 cm und eine Höhe von 1,5 cm.
Die Auswertung erfolgte wie bei DROSOPHILA mittels Schablone und Timesdia-Programmen.

C.1.3. Versuchsbedingungen

Um Aufschluß über das rhythmische Verhalten der Fliegen zu bekommen, wurden diese zunächst im RR, im DD, im LL und im LD registriert.

Es wurden folgende Lichtintensitäten verwendet:

im RR:	im LL:	im LD:
9×10^{-8} W/cm^2	1,80 lux	40,00 lux
6×10^{-8} W/cm^2	0,50 lux	8,00 lux
3×10^{-8} W/cm^2	0,04 lux	3,00 lux
		1,00 lux
		3×10^{-3} lux

Weiterhin wurde versucht, die Fliegen durch Temperaturzyklen zu synchronisieren (Bedingungen wie bei DROSOPHILA, vgl. B.1.3.1.)

C.1.4. Operative Methoden

Vor dem operativen Eingriff wurden die Fliegen für etwa 10 Tage im RR registriert. Nur Fliegen mit klarer Rhythmik dienten als Versuchstiere.
Bei der Operation wurde entweder ein optischer Trakt oder beide optischen Trakte durchtrennt oder versucht, die optischen Ganglien ganz zu entfernen (Lobektomie). Während der Operation waren die Fliegen etwa fünf bis zehn Minuten einer Lichtintensität von 6×10^4 lux ausgesetzt (Kaltlichtquelle; Gossen GKL 315). Kontrolltiere wurden entweder scheinoperiert oder nur beleuchtet.

C.1.4.1. Durchtrennung der optischen Trakte und Lobektomie

Für die Operation wurden die Tiere zunächst durch Einbetten in geschmeidig gemachtes Plastilin festgelegt. Der Kopf wurde vorsichtig nach vorne gebogen und mit Plastilin fixiert, um den Zugang zu den optischen Trakten von der Hinterseite der Kopfkapsel zu ermöglichen. Als Operationsmesser diente ein Rasierklingensplitter, der in einen Präpariernadelhalter eingeklemmt wurde. Geschnitten wurde entlang zwei von außen sichtbaren Cuticulaversteifungen, unter denen die optischen Trakte verliefen (Abb. 21).

Bei Scheinoperationen wurden die gleichen Schnitte gemacht, jedoch weniger tief, so daß die optischen Trakte nicht getroffen wurden.

Für die Lobektomie wurde nach Durchtrennung der optischen Trakte je ein kleines dreieckiges Fenster in die Cuticula des Hinterkopfes geschnitten und die optischen Ganglien zunächst mit einer Präpariernadel von der Innenseite der Augenkappe gelöst und dann mit einer feinen Pinzette entfernt.

Die Wunden wurden mit Wachs verschlossen (Schmelzpunkt 30°C).

Nach der Operation wurde die Aktivität der Fliegen für zwei bis drei Wochen im RR gemessen. Bei manchen noch zusätzlich eine Woche im LD bei 40 lux.

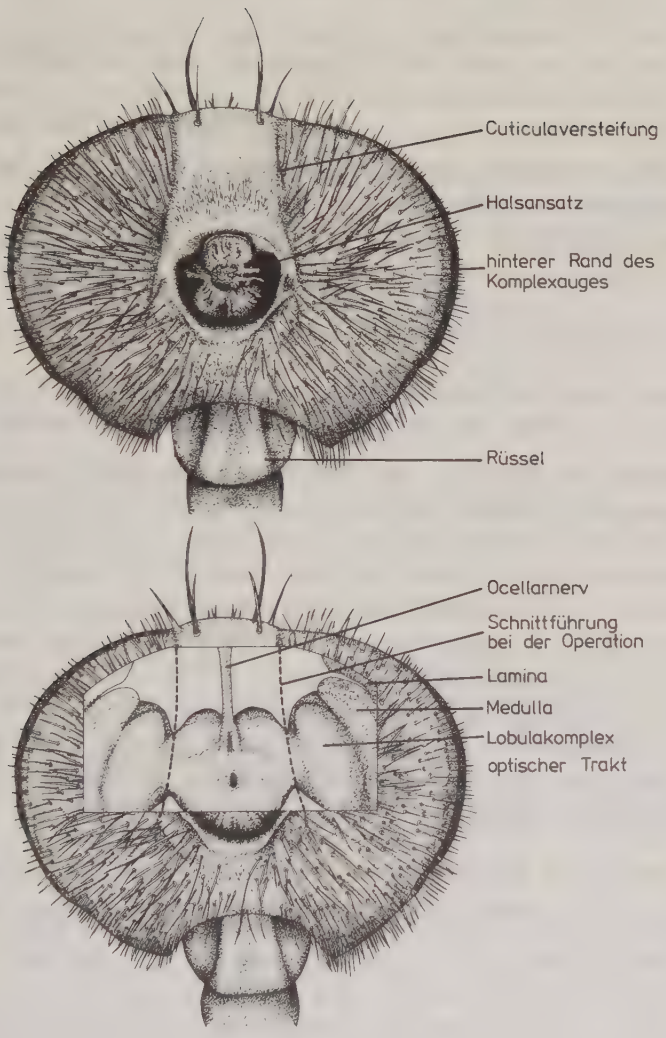


Abb. 21: Hinterseite des Kopfes von MUSCA DOMESTICA. Beim Durchtrennen der optischen Trakte wurden zur Orientierung der Schnitte von außen sichtbare Cutikulaversteifungen zur Hilfe genommen. Die Lage des Gehirns und der Schnitte ist in der unteren Zeichnung gezeigt (verändert nach Straussfeld, 1976).

C.1.4.2. Abdecken von Komplexaugen und Ocellen mit schwarzem Wachs

Um zu testen, ob sich nicht operierte, aber blinde Fliegen noch von LD-Zyklen synchronisieren lassen, wurden im LD bei einigen Fliegen die Komplexaugen und Ocellen mit schwarzem Wachs abgedeckt. Bei anderen nur die Komplexaugen oder nur die Ocellen. Das zum Schließen der Operationswunden verwendete Wachs wurde dazu mit Ruß vermischt.

C.1.5. Histologische Kontrolle

Die genaue Lage des Schnittes und die Vollständigkeit der Lobektomie wurde nach Ende des Versuchs histologisch untersucht.

Dazu wurde der Kopf mit der Front auf ein Paraffinblöckchen geklebt und die hintere Wand der Kopfkapsel entfernt, ohne das Gehirn zu beschädigen. Dieses wurde dann in situ für 10 Minuten mit "Chicago-Blue" gefärbt und mit Case-Puffer gespült. Chicago-Blue dringt nur langsam in intaktes Gewebe ein und färbt deshalb vor allem die Gehirnoberfläche. An den beschädigten Stellen kann der Farbstoff jedoch schneller ins Gehirn eindringen, wodurch die Lage des operativen Schnittes leicht erkennbar wird. Anschließend wurden die Köpfe mit Carnoy-Fixierlösung fixiert, mit Isopropanol entwässert und in Paraplast eingebettet. (Rezepte und genaues Vorgehen siehe Anhang.)

Mit einem Zeiss Wetzlar Serienschnittmikrotom wurden 10 µm dicke Serienschnitte angefertigt und diese lichtmikroskopisch untersucht.

C.2. Ergebnisse

C.2.1. Charakteristika der Laufaktivitätsrhythmik von MUSCA DOMESTICA

C.2.1.1. Verhalten in RR und DD

Die Fliegen wurden zu Ende der Lichtperiode des LD der Anzuchtbedingungen in RR gebracht und mindestens 2 Wochen registriert. Die längste Registrierdauer betrug 12 Wochen. Insgesamt wurde die Aktivität von 258 Fliegen im RR aufgezeichnet:

81,4 % der Tiere zeigten deutliche freilaufende Rhythmen,

14,7% hatten eine komplexe Rhythmik mit mehr als einer Komponente,

3,9 % waren arrhythmisch.

Es bestand kein Unterschied im Verhalten und in der Periodenlänge zwischen den Fliegen, die bei verschiedenen Lichtintensitäten des Rotlichts registriert wurden.

Fliegen mit deutlicher Rhythmik

Die Rhythmik dieser Tiere war sehr ausgeprägt. Aktivitäts- und Ruhezeit waren deutlich voneinander getrennt: Während der Aktivitätszeit waren die Tiere sehr aktiv, dagegen war in der Ruhezeit fast keine Aktivität zu beobachten.
Im hohen Alter wurde das Aktivitätsmuster manchmal verschwommener, und zwei bis drei Tage vor Tod der Tiere trat fast immer Hyperaktivität auf.

Abb. 22 zeigt die gefundenen Aktivitätsmuster von Fliegen mit deutlicher Rhythmik im RR nach Übergang vom LD. Während der ersten 3 bis 14 Tage im RR hatte die Mehrzahl der Tiere (59,0 %) eine Periodenlänge von 23,2 (±0,04) Stunden, die sich dann auf 24,7 (±0,04) Stunden verlängerte und im weiteren konstant blieb. Bei einem Tier (0,5 %) war es umgekehrt: Die Periodenlänge war erst lang (24,8 Std.) und dann kurz (23,35 Std.). Ein Teil der Fliegen (29,5 %) hatte von Anfang an eine lange Periodenlänge (25,0 ± 0,08 Std.), manche (4,3 %) behielten Zeit ihres Lebens eine kurze Periodenlänge (23,3 ± 0,15 Std.) bei. Der Rest (6,7 %) hatte von Anfang an eine Periodenlänge von genau 24,0 Std.

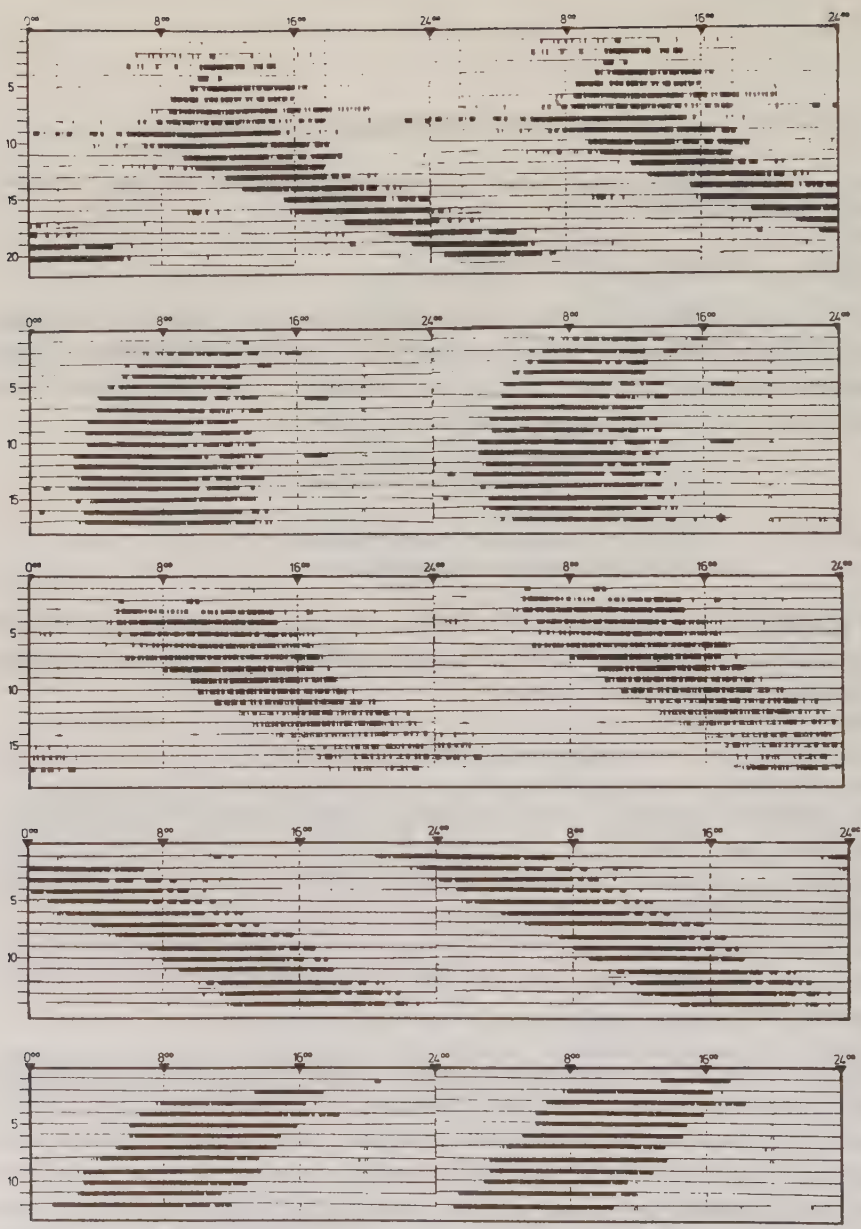


Abb. 22: Verschiedene Aktivitätsmuster von MUSCA DOMESTICA nach Übergang von LD in RR.

a) Bis zum neunten Tag ist τ <24 Std., dann verlängert es sich plötzlich auf 25,5 Std.
b) τ wird kontinuierlich länger.
c) τ ist >24 Std., aber Aktivitätsanfang und -ende haben ein unterschiedliches τ.
d) τ ist von Anfang an >24 Std.
e) τ bleibt <24 Std.

Nur 6 Fliegen wurden auch im DD registriert (Abb. 23). Die mittlere Periodenlänge dieser Fliegen lag bei 24,5 (±0,06) Stunden und war damit etwas kürzer als im RR (24,8 ± 0,10 Std.). Der Unterschied war bei $\alpha' = 0{,}01$ gerade nicht mehr signifikant (Wilcoxon-Test).

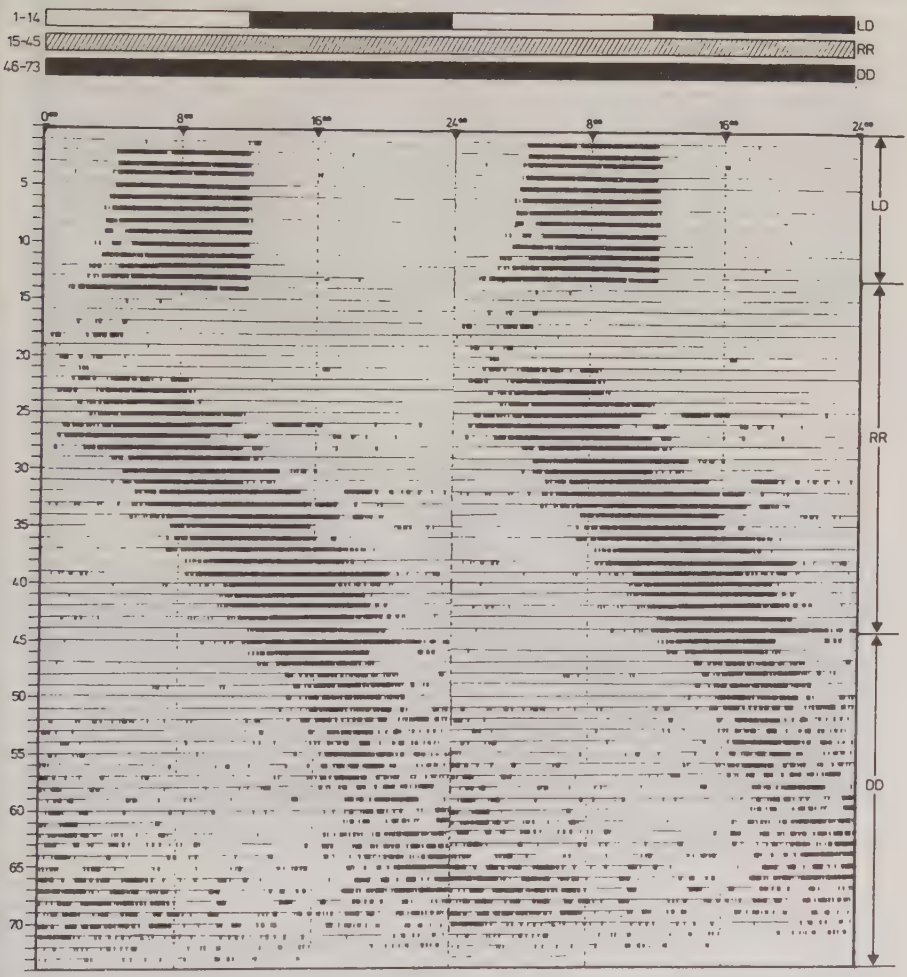


Abb. 23: Aktivität von MUSCA DOMESTICA im LD, RR und DD. Nach Ende des LD ist die Fliege wenig aktiv und τ ist < 24 Std. Am 20. Tag wird τ verlängert und bleibt bei 24,55 Std. konstant. Im DD beträgt τ 24,35 Std. und das Aktivitätsmuster wird undeutlicher.

Fliegen zwischen deutlicher und komplexer Rhythmik

Eine kleine Gruppe von Fliegen mußte nach Periodogrammanalyse zu den Fliegen mit deutlicher Rhythmik gerechnet werden, da nur eine signifikante Periodenlänge gefunden wurde, sie hatten jedoch eine biphasische Aktivität (Abb. 24): Parallel zur Hauptaktivität lief ein zweiter kleinerer Aktivitätsgipfel.

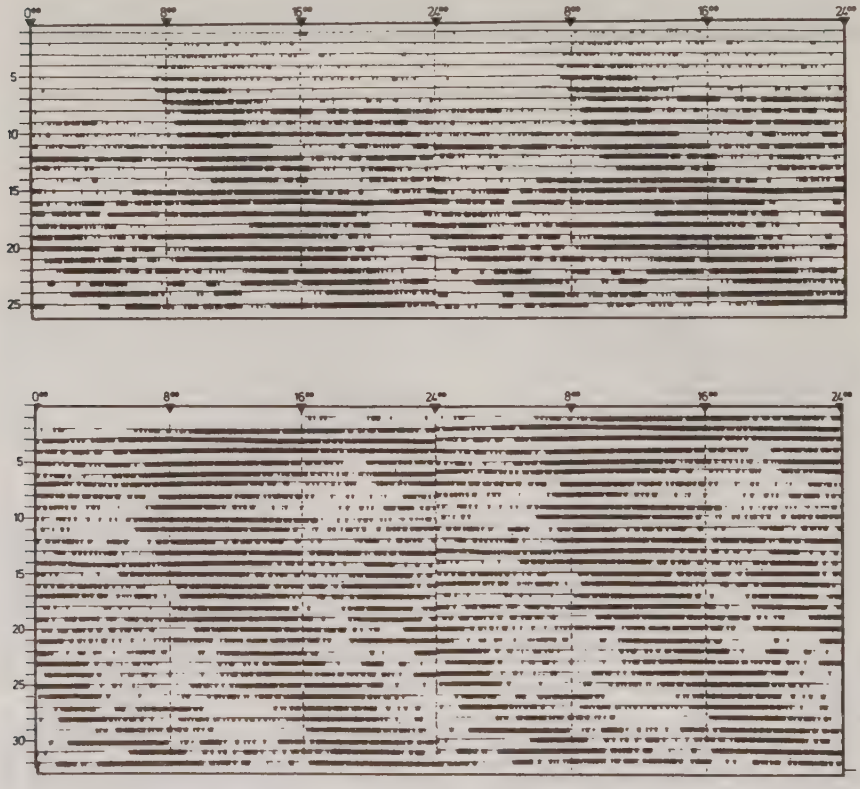


Abb. 24: Fliegen mit biphasischer Aktivität im RR.

Fliegen mit komplexer Rhythmik

Nach Periodogrammanalyse und optischer Beurteilung hatten 52,7 % dieser Fliegen mehr als zwei Komponenten, deren Periodenlängen jedoch nicht genau zu bestimmen waren (Abb. 25 b). Bei 47,4 % zeigten sich genau zwei Komponenten mit $\tau 1$ = 21,9 (±0,36) Stunden und $\tau 2$ = 25,4 (±0,14) Stunden (Abb. 25 a, c).

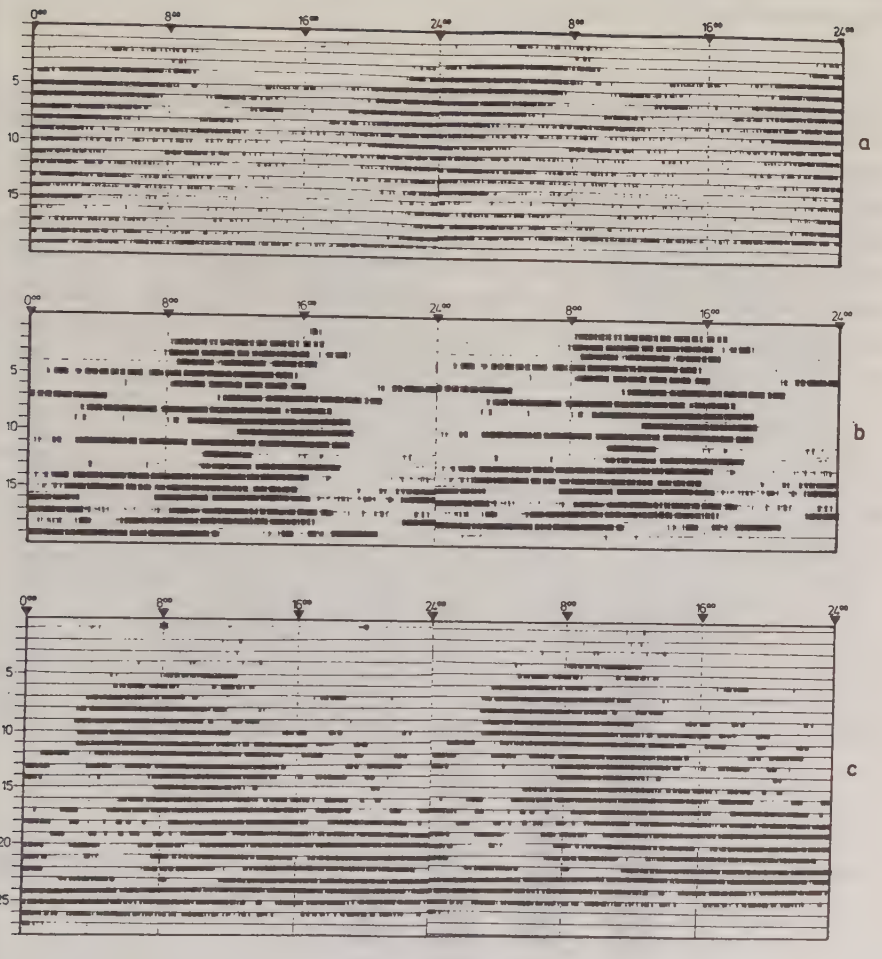


Abb. 25: Aktogramme von MUSCA DOMESTICA mit mehreren, freilaufenden Komponenten.

a) τ_1 = 23,0 Std. und τ_2 = 24,7 Std. alternieren miteinander. Anfangs ist das Aktivitätsmuster leicht biphasisch.
b) mehr als zwei Komponenten.
c) τ_1 = 21,5 Std. und τ_2 = 24,7 Std. prägen sich gleichzeitig aus. τ_2 dominiert stark

Der Aktivitätsspiegel von 80 % der Fliegen war normal, 10 % waren hyperaktiv und 10 % fast inaktiv.

C.2.1.2. Verhalten im LL

Das Verhalten im LL wurde bei drei Lichtintensitäten registriert: Bei 1,8 lux waren die meisten Fliegen arrhythmisch und viele gleichzeitig hyperaktiv (Abb. 27). Bei 0,5 lux und 0,04 lux stieg der Anteil der Fliegen mit deutlicher Rhythmik (Abb. 28), sehr viele hatten jedoch eine komplexe Rhythmik (Abb. 29). Abb. 26 zeigt die prozentuale Verteilung der verschiedenen Aktivitätsmuster bei den drei Lichtintensitäten.

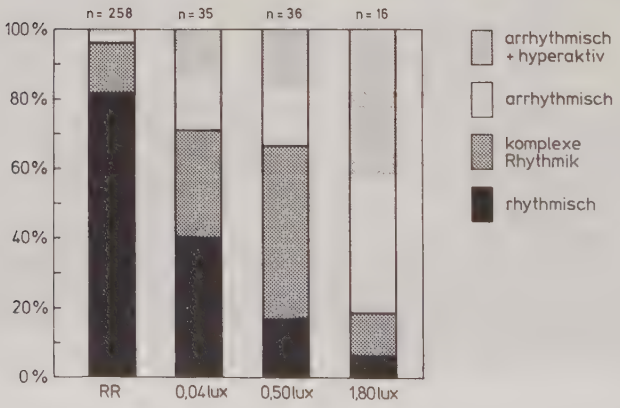


Abb. 26: Prozentualer Anteil von rhythmischen Fliegen, arrhythmischen Fliegen und Fliegen mit komplexer Rhythmik bei MUSCA DOMESTICA unter verschiedenen Lichtbedingungen.

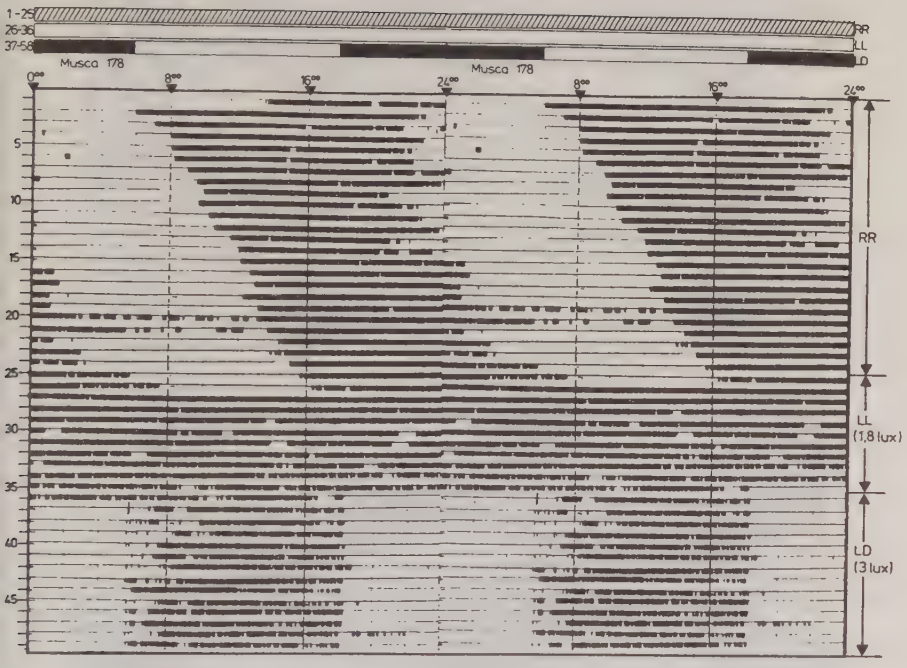


Abb. 27: Aktivität von MUSCA DOMESTICA im RR, LL von 1,8 lux und LD (3 lux).
Im LL ist die Fliege arrhythmisch und hyperaktiv.

Die Unterteilung in Fliegen mit klarer Rhythmik und solche mit komplexer Rhythmik war oft problematisch: Beide Zustände gingen manchmal ineinander über, Tiere mit an sich klarer Rhythmik änderten häufig ihre Periodenlänge (Abb. 28) und bei Tieren mit mehreren Komponenten herrschte oft eine vor (Abb. 29b).

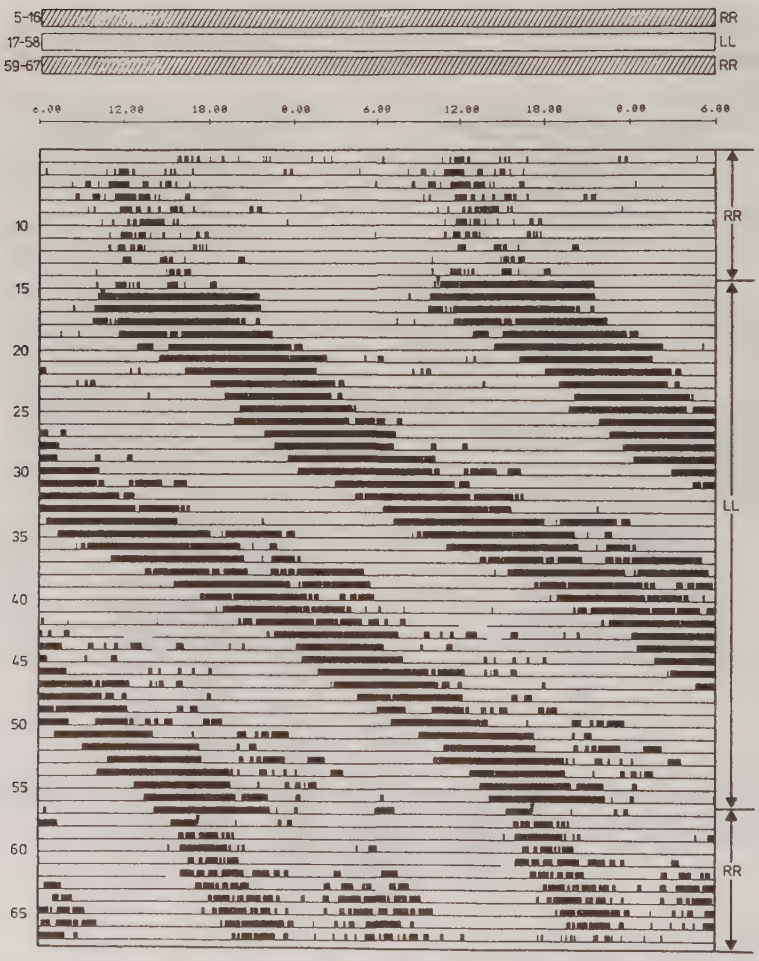


Abb. 28: MUSCA DOMESTICA mit klarer Rhythmik im LL von 0,5 lux. Obwohl die Rhythmik sehr deutlich ist, ist die Periodenlänge nicht so stabil wie normalerweise im RR.

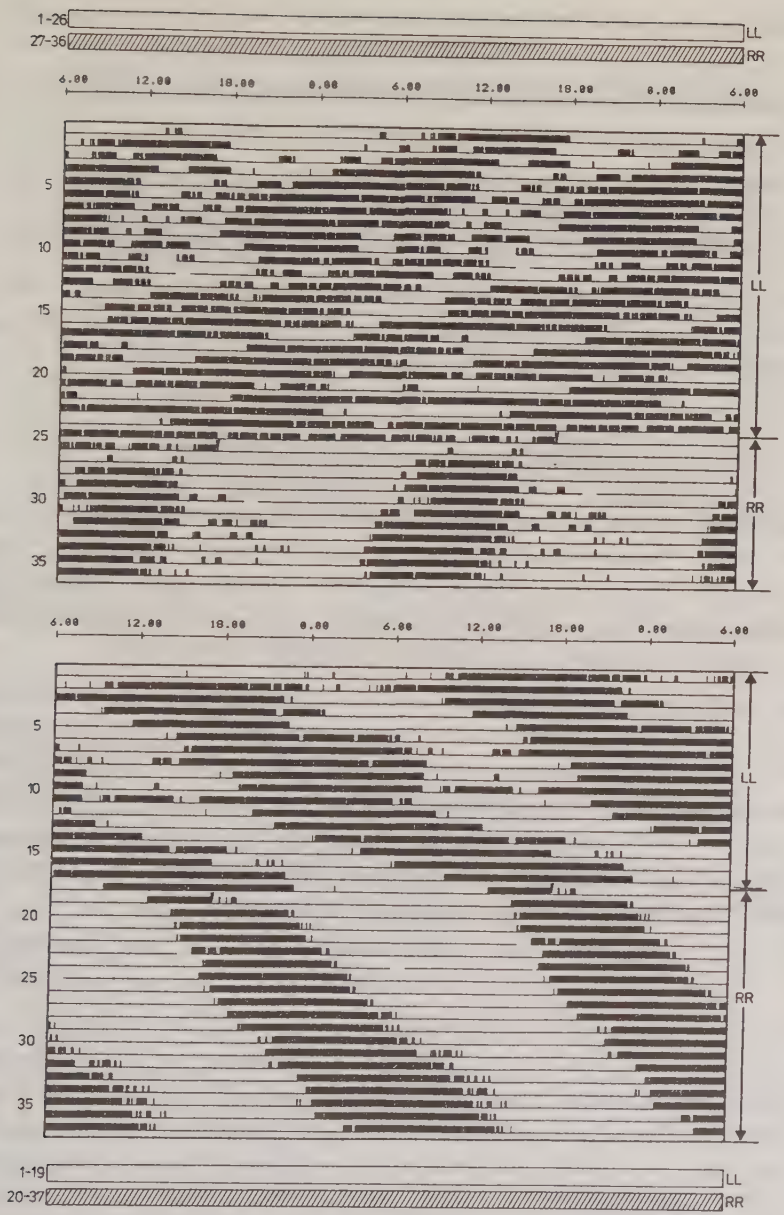


Abb. 29: Beispiele für komplexe Rhythmik im LL von 0,04 lux.

Vergleichder Periodenlängen von Tieren mit deutlicher Rhythmik im RR und im LL

Ein Vergleich war bei Tieren möglich, die sowohl im RR als auch im LL lange genug registriert worden waren (n = 19):

78,9% verlängerten ihre Periodenlänge im LL um durchschnittlich 0,74 (±0,12) Stunden im Vergleich zum RR;

21,1 % verkürzten sie um durchschnittlich 1,75 (±0,65) Stunden.

In beiden Richtungen war die Periodenveränderung signifikant (Wilcoxon-Test, α = 0,01). Es bestand kein Unterschied in der Periodenveränderung zwischen Tieren in 0,5 lux und 0,04 lux LL.

Übergang von LL nach RR

Bei rhythmischen Tieren war von Interesse, ob der Übergang von LL nach RR eine Phasenverschiebung in der Rhythmik bewirkt. Bei keinem der 20 Tiere mit klarer Rhythmik wurde eine Phasenverschiebung beobachtet, obwohl der Übergang zu verschiedenen circadianen Zeiten erfolgte (CT 0 bis CT 23,5) (vgl. Abb. 28).

Bei den arrhythmischen Fliegen wurde die Phasenlage der Rhythmik im RR zum Ende des LL bestimmt. Dies war nur bei sechs Tieren möglich. Die übrigen wurden nicht lange genug im RR registriert, oder waren auch im RR arrhythmisch. Bei den sechs untersuchten Fliegen war die Phasenlage zum Übergang von LL nach RR sehr ähnlich: Der Aktivitätsbeginn lag 8 bis 10 Stunden vor dem Übergang und das Aktivitätsende fiel mit ihm zusammen (Abb. 30).

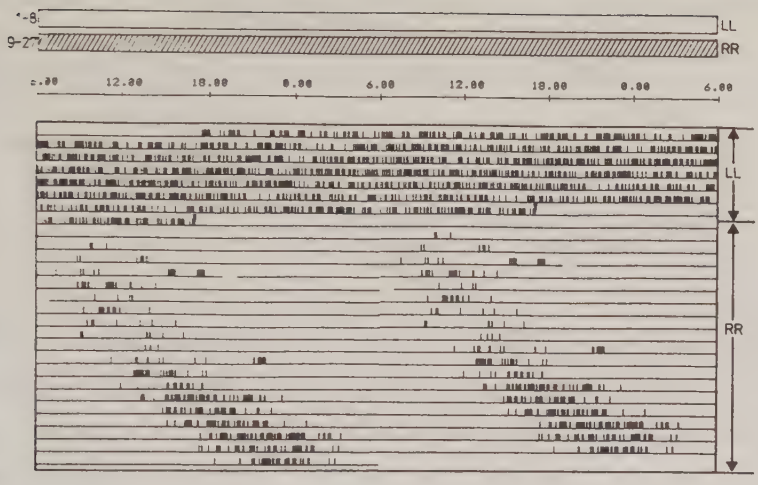


Abb. 30: Übergang einer im LL arrhythmischen Fliege vom LL (0,05 lux) in RR. Der Zeitpunkt des Übergangs scheint die Phasenlage der Rhythmik im RR zu bestimmen.

C.2.1.3. Verhalten im LD

Die zur Synchronisation von MUSCA verwendete maximale Lichtintensität betrug 40 lux, die geringste $3x10^{-3}$ lux.
Die meisten Fliegen waren sofort nach Einsetzen des LD synchronisiert. Bei anderen wurden Transients von maximal zwei Tagen beobachtet. Auch Phasenverschiebungen des LD folgten die Fliegen sofort oder mit sehr geringen Transients (vgl. Abb. 44).

Von 40 bis 1 lux waren nur geringfügige Änderungen im Synchronisationsmuster zu beobachten (Tab. 10):
Die Aktivität war ausschließlich auf die Lichtperiode beschränkt, begann bei den meisten Tieren unmittelbar mit Licht-an und endete schlagartig nach Licht-aus (vgl. Abb. 27, 31b, 34). Manche Tiere zeigten keine Aktivität direkt nach Licht-an (vgl. Abb. 46b). Seltener hörte die Aktivität auf, bevor das Licht ausging. Wenige Tiere zeigten ein bimodales Aktivitätsmuster.

Tabelle 10

Aktivitätsmuster von MUSCA DOMESTICA
bei verschiedenen Lichtintensitäten im LD.

	n	unimodale Aktivität			bimodale Aktivität	unregelmäßig synchronisiert	
		Aktivitätsbeg. u. -ende mit L-an u. L-aus	Aktivitätsbeg. etwas später	Aktivitätsende etwas früher			invers
40 lux	20	60,0 %	20,0 %	0,0 %	15,0 %	5,0 %	0,0 %
8 lux	12	67,0 %	16,5 %	0,0 %	16,5 %	0,0 %	0,0 %
3 lux	36	55,5 %	19,5 %	3,0 %	8,0 %	8,0 %	6,0 %
1 lux	20	60,0 %	20,0 %	10,0 %	10,0 %	0,0 %	0,0 %
$3x10^{-3}$ lux	16	0,0 %	81,3 %	12,5 %	0,0 %	6,2 %	0,0 %

Bei Absenken der Lichtintensität auf $3x10^{-3}$ lux änderte sich das Aktivitätsmuster:
Das Aktivitätsband wurde zunächst schmaler (Abb. 31). Bei 13 Tieren (81,3 %) beschränkte es sich auf die zweite Hälfte der Lichtperiode, bei 2 Tieren (12,5 %) verlagerte es sich nach vorne und bei einem Tier (6,2 %) zuerst ans Ende, dann an den Anfang und schließlich wieder ans Ende der Lichtperiode. Es wurde zu den Tieren mit unregelmäßiger Synchronisation gerechnet (Tab. 10). Eine Fliege zeigte kurz nach Verlagerung der Aktivität nach hinten Freilauf, eine andere nach 11-tägiger Synchronisation (Abb. 31a).

Bei den anderen, deren Aktivität sich zunächst auf die zweite Hälfte der Lichtperiode beschränkte, blieb ein Teil der Aktivität mehr oder weniger gut synchronisiert, während sich eine zweite Komponente (zumeist mit langer Periodenlänge) abspaltete (Abb.

31b). In einem Fall wurde die vorwiegend aufs Licht beschränkte Aktivität von schräglaufenden Bändern von Nichtaktivität durchzogen (Abb. 32a). Eine andere Fliege zeigte nach Verlust der Synchronisation vorübergehend splitting (Abb. 32b).

Abb. 31 (siehe nächste Seite):
Aktivitätsmuster von MUSCA DOMESTICA im LD bei Absenken der Lichtintensität. Bis zur Lichtintensität von 1 lux beginnt die Aktivität mit L-an und endet mit L-aus. Bei $3x10^{-3}$ lux beschränkt sie sich auf die zweite Hälfte der Lichtperiode.

a) Die Fliege zeigt nach 11 Tagen LD mit $3x10^{-3}$ lux Freilauf.
b) Ein Teil der Aktivität bleibt synchronisiert, der andere läuft mit τ = 26,0 Std. frei.

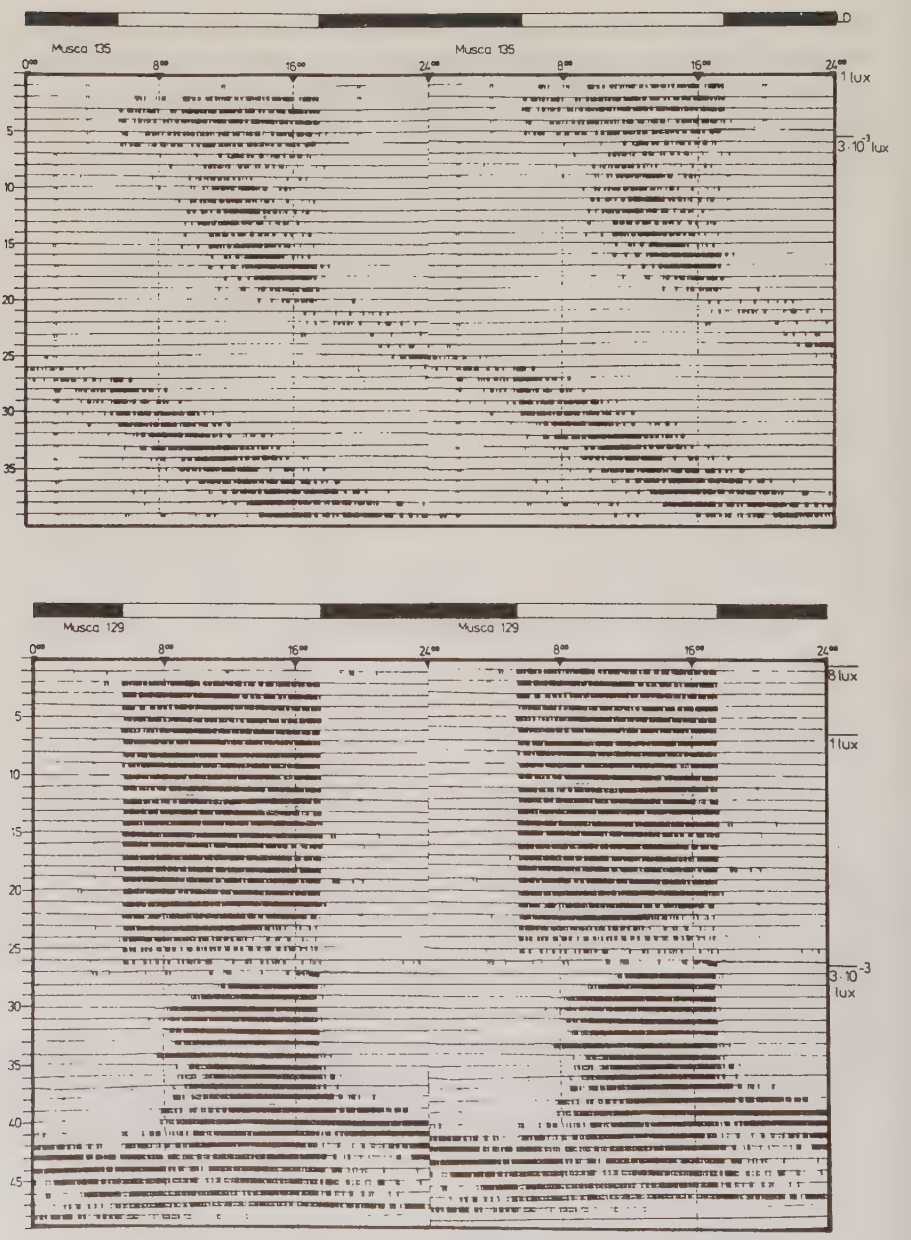


Abb. 31 (Legende siehe S. 83)

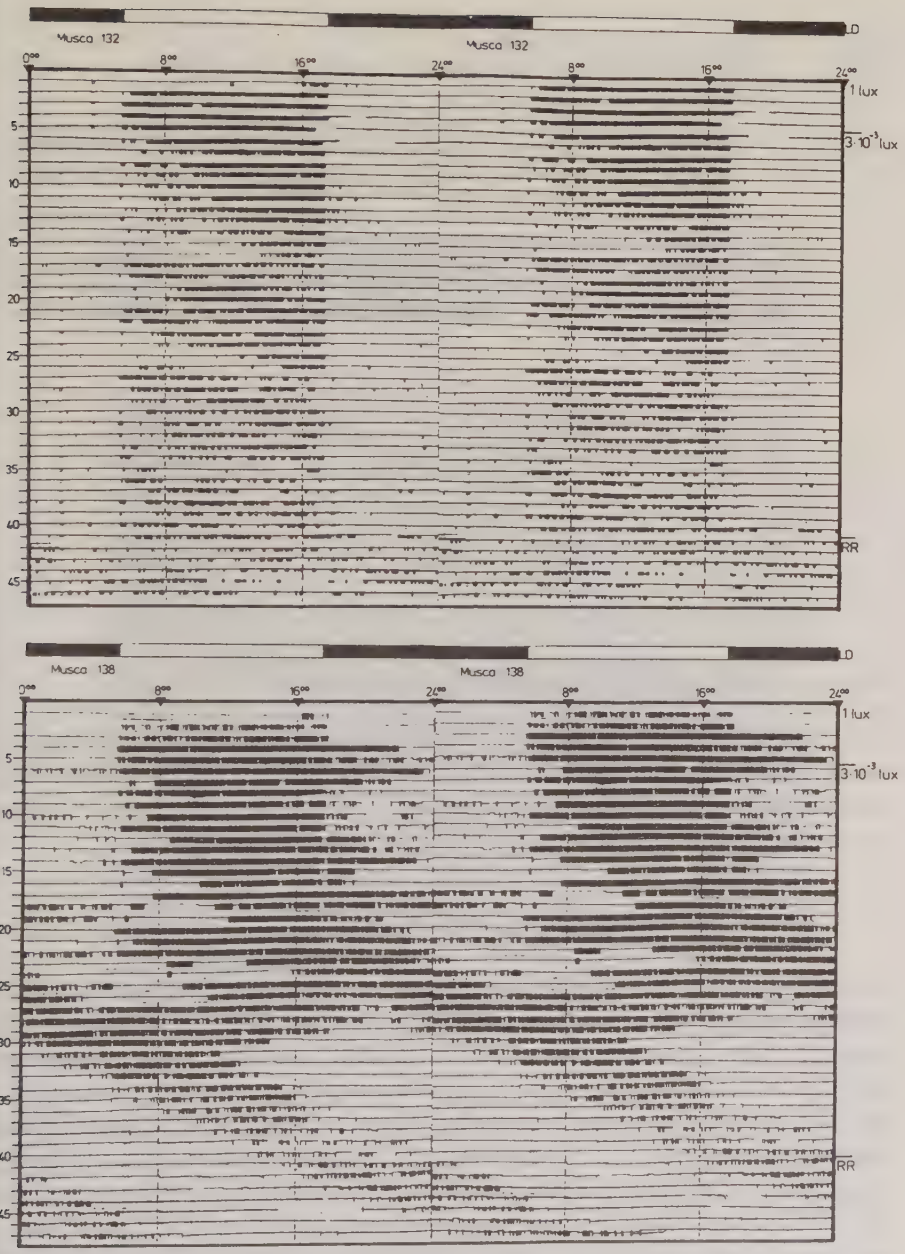


Abb. 32 (Legende siehe S. 86)

Abb. 32 (siehe vorige Seite):
Aktivitätsmuster von MUSCA DOMESTICA im LD bei 3×10^{-3} lux.

a) Die Fliege bleibt synchronisiert. Die schräg durch die Aktivitätszeit durchlaufenden Bänder von Nichtaktivität könnten jedoch Ausdruck einer unterschwellig freilaufenden Komponente sein.
b) Die Fliege ist nur während der ersten Tage synchronisiert. Dann läuft sie zunächst mit τ = 25,6 Std. frei und kurz danach spaltet sich eine zweite Komponente mit τ = 21,2 Std. ab. Ab dem 32. Tag sind beide vereinigt, und die Fliege läuft mit τ = 25,3 Std. frei.

C.2.1.4. Verhalten in Temperaturzyklen (12:12)

Von 28 Fliegen ließen sich 17 (60,7 %) durch einen 16tägigen Temperaturzyklus synchronisieren, sechs (21,4 %) wurden nicht synchronisiert und bei fünf (17,9 %) konnte keine klare Aussage getroffen werden, da sie nach 7 bis 10 Tagen starben.

Synchronisierte Fliegen

Die Fliegen hatten ihre Hauptaktivität in der Warmperiode des Temperaturwechsels. Bei sieben Fliegen fiel der erste Temperaturanstieg fast genau in CT 0 des Freilaufs; es war also keine Phasenverschiebung zum Erreichen der Synchronisation nötig (Abb. 33). Bei 10 Fliegen war der Temperaturzyklus gegen die ursprüngliche Rhythmik verschoben. Eine dieser Fliegen synchronisierte sich trotzdem innerhalb von wenigen Tagen. Die anderen 9 brauchten bis zu 10 Tage, bis sie mit dem Temperaturzyklus synchron waren. Bei 4 von ihnen gab es neben der synchronisierten Aktivität unterschwellig freilaufende Komponenten (Abb. 34).

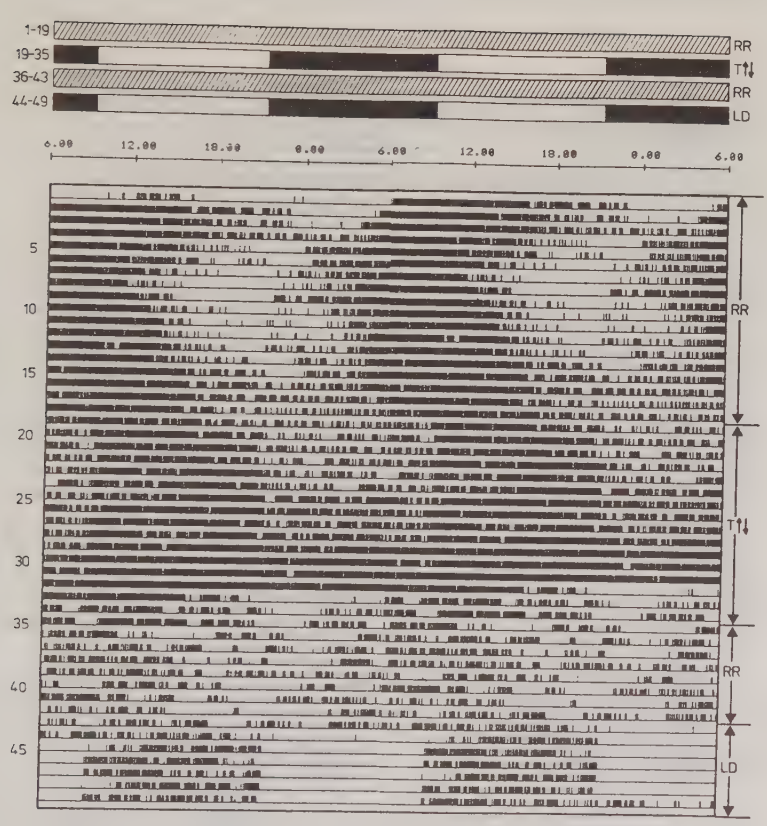


Abb. 33: Synchronisation von MUSCA DOMESTICA durch einen Temperaturwechsel mit einem Temperaturunterschied von 2°C. Zur Synchronisation war keine Phasenverschiebung nötig.

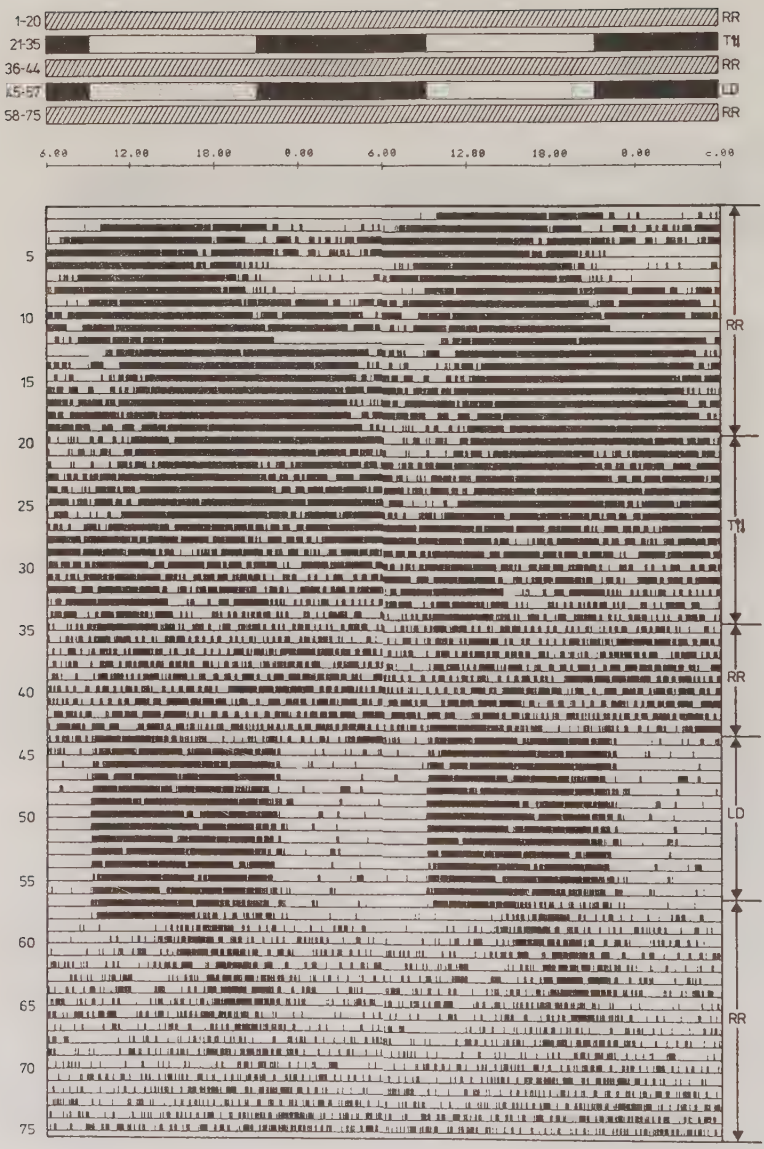

1-20
21-35
36-44
45-57
58-75
RR
TN
RR
LD
RR
6.00
12.00
18.00
0.00
6.00
12.00
18.00
0.00
6.00
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
RR
TN
RR
LD
RR

Abb. 34

Abb. 34: Synchronisation von MUSCA DOMESTICA durch einen Temperaturwechsel und durch einen LD (3 lux). Zur Synchronisation mit dem Temperaturwechsel wurden einige Tage benötigt und unterschwellig könnten auch nach Synchronisation noch freilaufende Komponenten vorhanden sein. Die Synchronisation durch LD erfolgte sofort und das Aktivitätsmuster war wesentlich klarer als im Temperaturwechsel.

Nicht synchronisierte Fliegen

Zu Beginn des Temperaturwechsels waren zwei Fliegen in Phase mit demselben, zeigten aber trotzdem einen freilaufenden Rhythmus mit τ >24 Stunden. Die übrigen 4 waren zu Beginn des Temperaturwechsels außer Phase mit diesem; alle Fliegen bewegten sich in Richtung der Wärmephase des Temperaturwechsels. Drei Fliegen hatten sie gegen Ende des Temperaturwechsels erreicht. Möglicherweise wären sie danach synchronisiert gewesen.

C.2.2. Laufaktivität von operierten Fliegen im RR

C.2.2.1. Auswirkung der Operationen auf die Laufaktivitätsrhythmik

Die meisten Fliegen hatten nach der Operation eine weniger deutliche Rhythmik als vorher. Dies war einerseits auf einen erhöhten Aktivitätsspiegel (in 75 % aller operierten Fliegen) und andererseits auf den Verlust klarer Ruheperioden (♀) zurückzuführen (Tabelle 11).
Veränderungen wurden auch im Aktivitätsmuster der Fliegen beobachtet. Es konnten wiederum drei Aktivitätstypen unterschieden werden: Fliegen mit deutlicher Rhythmik (Abb. 35), Fliegen mit komplexer Rhythmik (siehe Abb. 43b) und arrhythmische Fliegen (siehe Abb. 43c). Tabelle 12 gibt die Verteilung dieser drei Typen für die unterschiedlichen Operationen wieder. Nur bei den Kontrollen waren alle Fliegen rhythmisch.

Tabelle 11

Aktivitätsspiegel, Änderung des Aktivitätsspiegels und Verhältnis von Aktivitätszeit zu Ruhezeit (α:ϱ) bei operierten Fliegen und Kontrollen

	n	Aktivitäts-spiegel	mittl. Anstieg des Aktivitäts-spiegels	n	α : ϱ
vor Operation	53	1,64 ± 0,08	0,70 ± 0,12 *	20	0,774 ± 0,094
nach "		2,31 ± 0,10			2,428 ± 0,407 *
vor Scheinop.	20	1,53 ± 0,10	0,09 ± 0.16	20	0,708 ± 0,096
nach "		1,62 ± 0,17			0,721 ± 0,060
vor Lichtpuls	15	1,61 ± 0,16	0,27 ± 0,13	15	0,727 ± 0,045
nach "		1,75 ± 0,17			0,940 ± 0,148

* signifikant bei α'= 0,005 (Wilcoxon-Test)

Tabelle 12

Aktivitätstypen von MUSCA DOMESTICA nach beid- und einseitiger Durchtrennung der optischen Trakte, Lobektomie, Scheinoperation und Lichtpulsen

	n	klare Rhythmik	komplexe Rhythmik	Arrhythmie	davon hyper-aktiv
einseitige Durchtrennung d. opt. Trakte	14	35,7 %	21,4 %	42,9 %	100 %
beidseitige Durchtrennung d. opt. Trakte	53	52,8 %	18,9 %	28,3 %	67 %
Lobektomie	10	50,0 %	30,0 %	20,0 %	100 %
Scheinop.	20	100,0 %	0,0 %	0,0 %	
Lichtpuls	15	100,0 %	0,0 %	0,0 %	

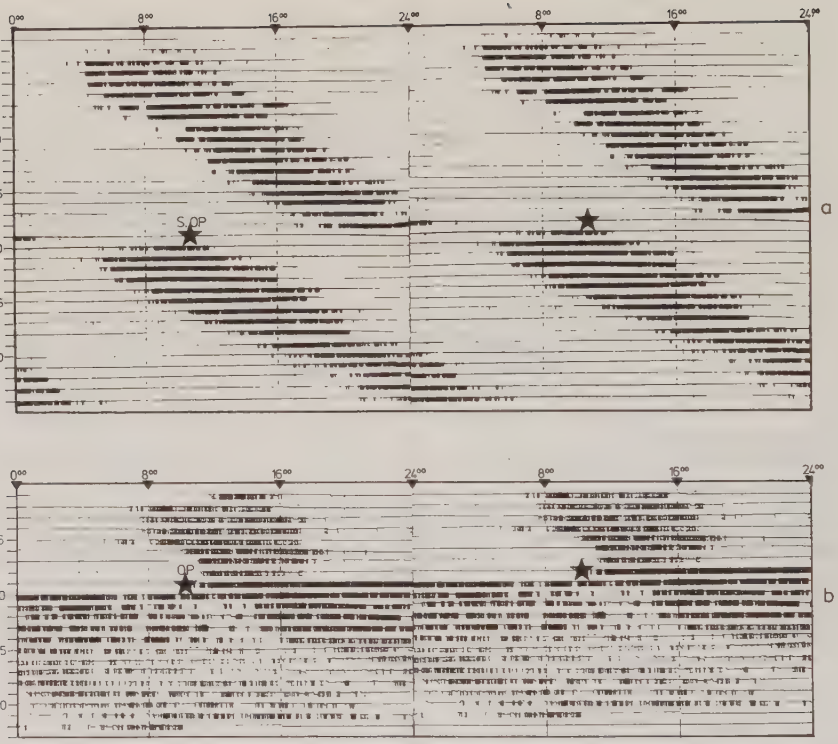


Abb. 35: Aktivitätsmuster von MUSCA DOMESTICA im RR nach Scheinoperation (a) und Durchtrennen beider optischer Trakte (b). In beiden Fällen bleibt die Rhythmik erhalten und verlängert ihr τ nach dem Eingriff. Bei b wird zusätzlich der Aktivitätsspiegel erhöht und $\alpha : \varrho$ vergrößert.

C.2.2.2. Histologische Untersuchung

Bei allen einseitig operierten Fliegen war die Durchtrennung des optischen Traktes vollständig. Von den 53 Fliegen mit beidseitiger Operation hatten 28 vollständige, richtig plazierte Schnitte auf beiden Seiten. Bei 9 Fliegen war die Operation auf einer Seite gelungen, aber auf der anderen Seite lag der Schnitt mehr distal. Die übrigen 16 Fliegen hatten auf einer Seite Schnitte durch den optischen Trakt oder durch den Lobulakomplex, auf der anderen Seite war die Durchtrennung nicht vollständig.

Neurale Verbindungen zwischen Gehirn und optischen Ganglien wurden nach gelungener Operation in keinem der untersuchten Fälle wieder hergestellt.
Bei der Mehrzahl der Fliegen waren die optischen Ganglien degeneriert, was am Vorhandensein von vielen kleinen "Vakuolen" im Gewebe zu erkennen war (Abb. 36, 37). Diese degenerierten Regionen wurden normalerweise viel stärker angefärbt als der Rest des Hirngewebes (Abb. 36a,b, 37a). Auch distale Teile des Protocerebrums waren in unterschiedlichem Ausmaß von der Degeneration betroffen (Abb. 36c, 37c,d), aber niemals wurden "Vakuolen" in den Pilzkörpern, im Zentralkomplex oder in den Antennenloben gefunden.

Degenerationen in den optischen Ganglien und manchmal auch im Protocerebrum wurden auch bei Fliegen mit Schnitten durch den Lobulakomplex (Abb. 36b) und bei Fliegen mit unvollständiger Durchtrennung des optischen Traktes gefunden (Abb. 36c).

Die versuchte Lobektomie war in keinem Fall vollständig. Teile der Lamina und manchmal Stücke des Lobulakomplexes waren noch vorhanden. Allerdings hatten sie meist keine Verbindung mit dem Gehirn und waren stark degeneriert (Abb. 37b).

Abb. 36 (siehe nächste Seite): Beispiele für vakuolisierte Regionen in den optischen Ganglien (a, b) und im distalen Bereich des Zentralgehirns (c).

a) Schnitt zwischen Gehirn und Lobulakomplex mit tief gefärbten optischen Ganglien. (Tier blieb rhythmisch.)
b) Schnitt durch den Lobulakomplex. Die tief gefärbten optischen Ganglien sind auf beiden Seiten des Schnittes degeneriert. (Tier blieb rhythmisch.)
c) Unvollständiger Schnitt mit Degenerationen in Teilen des Zentralgehirns und der optischen Ganglien. (Tier wurde arrhythmisch).

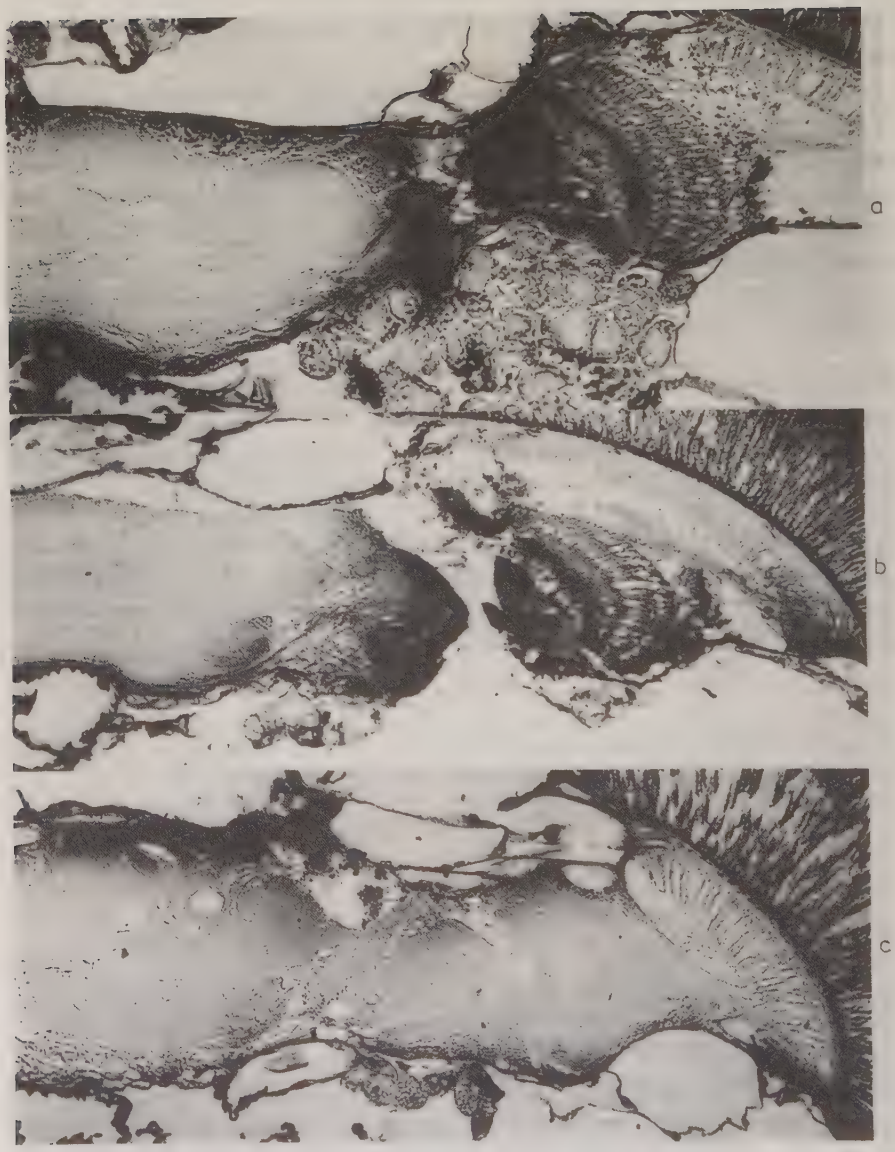


Abb. 36 (Legende siehe S. 93).

Abb. 37 (Legende siehe S. 96).

Abb. 37 (siehe vorige Seite): Histologische Beispiele, die die Korrelation zwischen Lage von degeneriertem Gewebe und rhythmischem Verhalten illustrieren.

a) Vollständiger Schnitt. Die optischen Ganglien sind degeneriert, während das Zentralgehirn normal erscheint. Das Tier war rhythmisch.
b) Lobektomie. Teile der optischen Ganglien sind noch vorhanden, aber degeneriert. Es gibt keine degenerierten Regionen im Zentralgehirn. Das Tier war rhythmisch.
c) Wenige große Vakuolen nahe der großen Kommissur. Das Tier war rhythmisch.
d) Vollständiger Schnitt. Die optischen Ganglien sind degeneriert und auch im Zentralgehirn gibt es ausgedehnte degenerierte Regionen im ventrolateralen und hinteren Protocerebrum. Das Tier war arrhythmisch.
e) Kontrollfliege. Färbung und Fixierung erfolgten sofort nach der Operation. Keine sichtbare Vakuolenbildung.

C.2.2.3. Korrelation zwischen postoperativem Verhalten und histologischem Befund

Es wurde keinerlei Korrelation gefunden zwischen der Lage der operativen Schnitte und dem Auftreten von Rhythmizität (klare und komplexe Rhythmik) und Arrhythmie (Abb. 38a). Jedoch waren diese Aktivitätstypen mit dem Vorhandensein von Vakuolen im Zentralgehirn korreliert (Abb. 38b):
In der Gruppe ① (Abb 38b) mit Vakuolen in beiden lateralen Hälften des Zentralgehirns war der Anteil arrhythmischer Fliegen signifikant höher als in den anderen Gruppen. Dagegen waren alle Fliegen ohne Vakuolen im Gehirngewebe (Gruppe ⑤, Abb. 38b) rhythmisch.

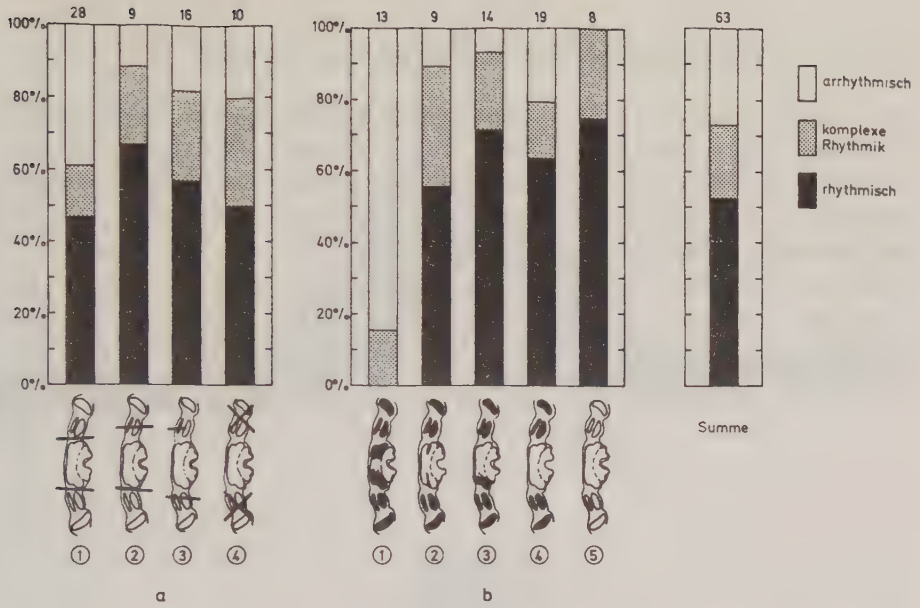


Abb. 38: Prozentualer Anteil von rhythmischen, arrhythmischen Fliegen und solchen mit komplexer Rhythmik in Abhängigkeit von:

a) Der Lage des Schnittes (unterhalb des Diagramms gezeigt: ① bis ③ Schnitte, ④ Lobektomie).
b) Dem Grad der Degeneration (die degenerierten Regionen sind schwarz markiert).

Die Anzahl der Versuchstiere ist jeweils über den Säulen angegeben. Die Säule ganz rechts zeigt die Summe aller Tiere.

Betrachtet man alle arrhythmischen Fliegen für sich, so zeigt sich, daß 65 % von ihnen Degenerationen auf beiden Seiten des Zentralgehirns haben. 30 % der arrhythmischen Fliegen haben keine degenerierten Bereiche im Zentralgehirn. Jedoch waren alle diese Fliegen extrem hyperaktiv (vgl. Abb. 43d), was das Erkennen einer eventuell vorhandenen Rhythmik schwierig macht.

Auch einige nach der Operation rhythmische Fliegen hatten vakuolisierte Bereiche im Zentralgehirn. Jedoch waren die degenerierten Regionen kleiner als bei arrhythmischen Fliegen und kamen nie in beiden Gehirnhälften gleichzeitig vor. Meistens lagen sie genau zwischen ventrolateralem und hinterem Protocerebrum (Abb. 37c).

C.2.2.4. Charakteristika der postoperativen Rhythmen

Nach Durchtrennen der optischen Trakte wurden 25 der rhythmischen Fliegen lang genug registriert, um ihre postoperativen Rhythmen genauer zu untersuchen. Dies beinhaltete die Bestimmung und den Vergleich von prä- und postoperativen Periodenlängen (Tabelle 13) und der Phase der Rhythmen.
Fast alle Fliegen verlängerten ihre Periode nach der Operation (Abb 39). Das wurde allerdings auch bei scheinoperierten oder nur "belichteten" Fliegen gefunden (Abb. 40). Die Periodenverlängerung war signifikant ($\alpha' = 0{,}01$; Wilcoxon-Test).

Tabelle 13

Änderungen in der Periodenlänge nach Durchtrennung der optischen Trakte, Lobektomie, Scheinoperation und Lichtpulsen.

	n	vor Behandlung (Stunden)	nach Behandlung (Stunden)	Differenz (Stunden)
Durchtrennung der optischen Trakte	20	24,9 ± 0,16	25,6 ± 0,14	0,66 ± 0,11
Lobektomie	3	24,8 ± 0,48	26,0 ± 0,45	1,23 ± 0,07
Scheinop.	20	25,3 ± 0,18	25,6 ± 0,10	0,31 ± 0,13
Lichtpuls	15	25,0 ± 0,23	25,3 ± 0,23	0,32 ± 0,05

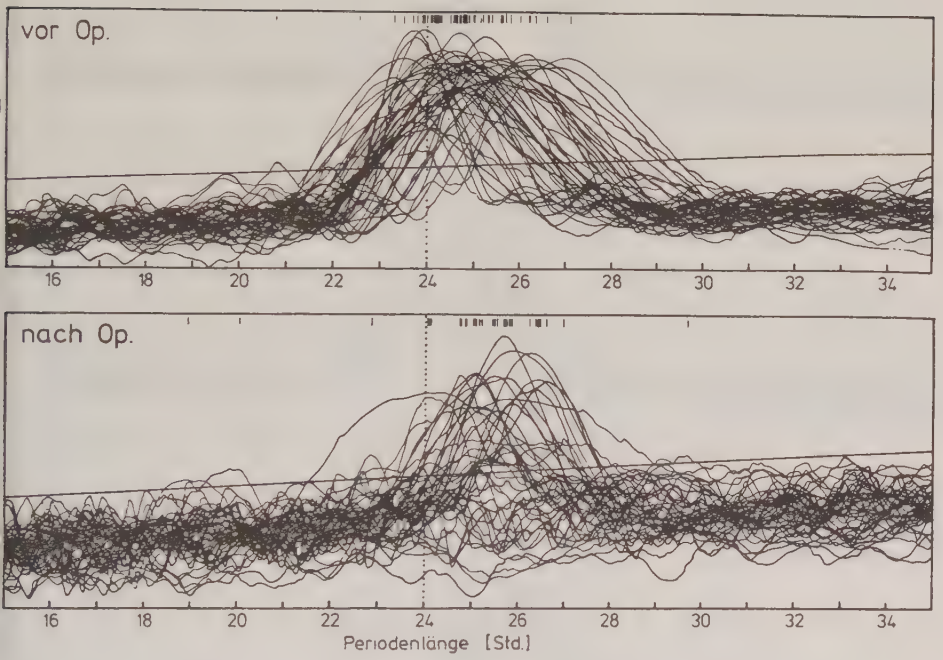


Abb. 39: Übereinandergezeichnete Periodogramme aller Fliegen mit durchtrennten optischen Trakten vor und nach der Operation. Die gefundenen Periodenlängen sind am oberen Rand der Diagramme mit Strichen markiert.

Abb. 40 (siehe nächste Seite): Übereinandergezeichnete Periodogramme (jeweils vor und nach Behandlung) von scheinoperierten Tieren (a) und Tieren, denen ein fünfminütiger Lichtpuls (6×10^4 lux) gegeben wurde (b).

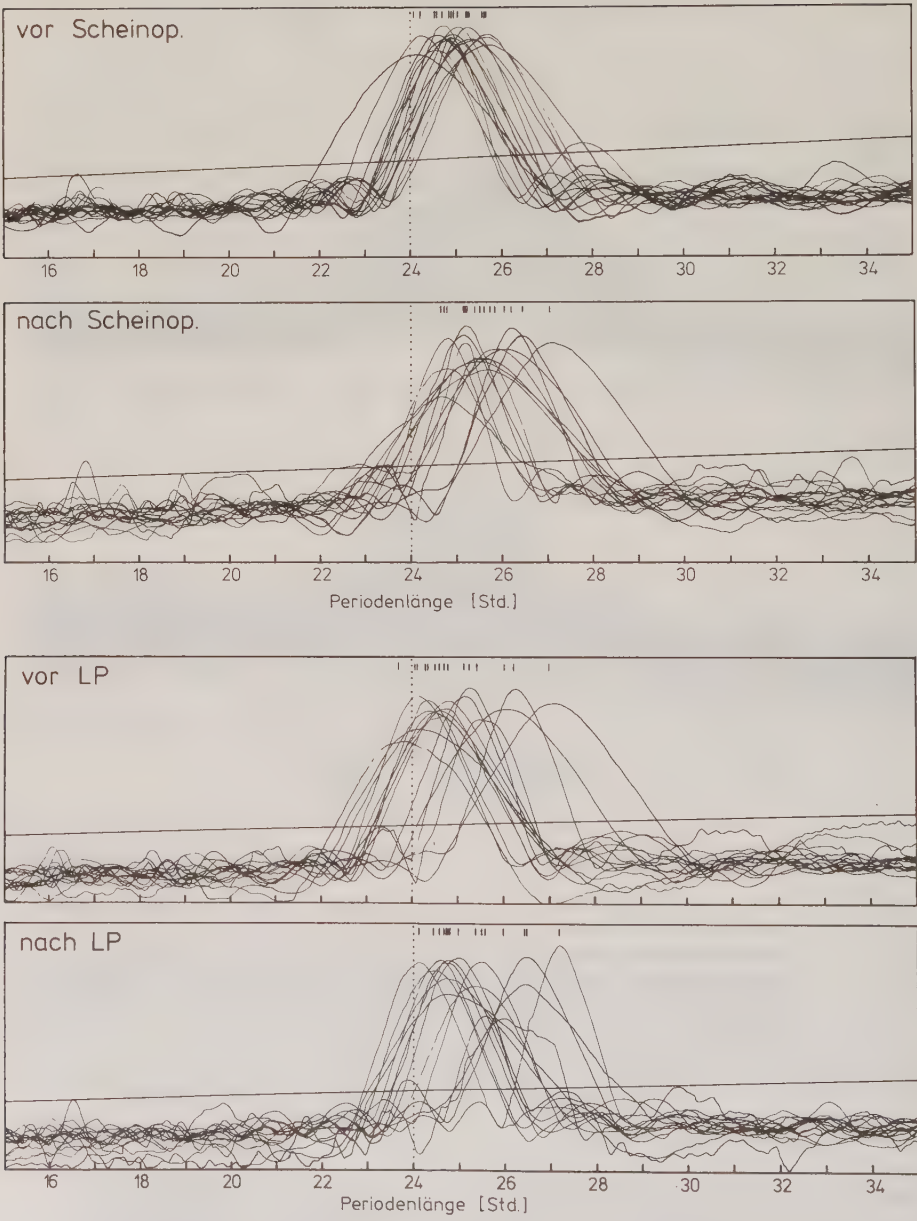


Abb. 40 (Legende siehe S. 99).

Zusätzlich bewirkten alle Behandlungen eine beträchtliche Phasenverschiebung.

Die Änderung in der Periodenlänge war weder mit der circadianen Zeit, zu der der Eingriff durchgeführt wurde, korreliert noch mit Richtung (delay oder advance) oder Betrag der Phasenverschiebung, die durch die Behandlung bewirkt wurden. Es gab eine leichte Tendenz bei Fliegen mit kürzeren Periodenlängen, diese nach den Operationen stärker zu verlängern als solche mit längeren τ's (Spearman-Rank-Korrelations-Koeffizient $r^s = 0{,}5$).

Die beobachteten Phasenverschiebungen waren abhängig von der circadianen Zeit, zu der die Störung erfolgte (Abb. 41). Es wurde kein Unterschied zwischen operierten, scheinoperierten und nur belichteten Fliegen gefunden. Da Licht der einzige gemeinsame Faktor bei allen Behandlungen war, sind die beobachteten Phasenverschiebungen Reaktionen auf das Licht. Abb. 41 stellt folglich eine Phasenresponsekurve von MUSCA DOMESTICA auf 5 Minuten Störlicht von 6×10^4 lux dar.

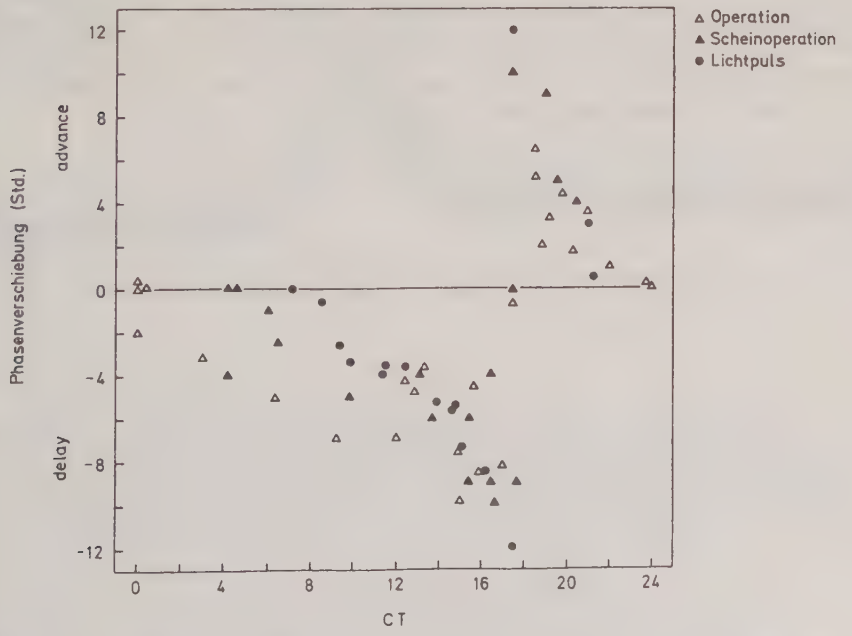


Abb. 41: Phasenresponse auf fünfminütiges Weißlicht (6×10^4 lux). Operierte (Durchtrennung der optischen Trakte oder Lobektomie), scheinoperierte und nicht operierte Fälle sind durch verschiedene Symbole wiedergegeben.

C.2.3. Laufaktivität von operierten Fliegen im LD

Um zu testen, ob Fliegen mit durchtrennten optischen Trakten noch auf einen Licht-Dunkel-Wechsel reagieren können, wurde die Laufaktivität im LD 12:12 bei 40 lux in der Lichtphase registriert.

Alle Fliegen wurden synchronisiert (Abb. 42). Jedoch war bei den Fliegen, deren optische Trakte vollständig durchtrennt waren, die Aktivität mit dem LD außer Phase. Sie begann während der zweiten Hälfte der Lichtphase und dauerte bis "Mitternacht" an (Abb. 43, 44). Der Phasenwinkel zwischen Licht-an und Aktivitätsbeginn betrug in vielen Fällen genau 6 Stunden. Abb. 44 zeigt eine Fliege, bei der der Licht-Dunkel-Wechsel vor der Operation um 6 Stunden vorverschoben wurde. Nach der Operation verlagerte sich die Aktivität nach hinten, als ob der LD wieder um 6 Stunden nach hinten verschoben worden wäre.
Andere Fliegen waren nach der Operation invers aktiv, d.h. dunkelaktiv.

Bemerkenswert ist, daß alle Fliegen synchronisiert wurden, auch solche, die vorher im RR arrhythmisch (Abb. 43c) oder hyperaktiv (Abb. 43d) waren. Einige der hyperaktiven Fliegen waren nach Ende des LD im folgenden RR wieder rhythmisch (Abb. 45).

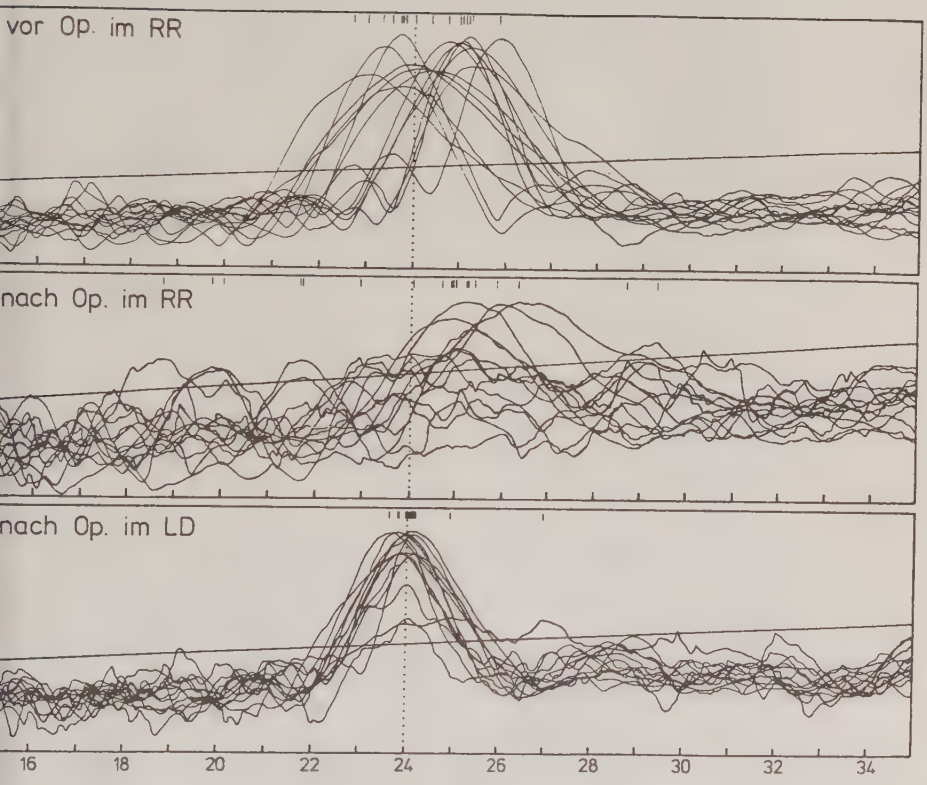


Abb. 42: Synchronisation von blinden Fliegen im LD (40 lux). Die Periodogramme der Einzeltiere wurden übereinander gezeichnet. Das mittlere Diagramm zeigt die Periodenlängen nach der Operation im RR. Im unteren Diagramm liegen sie alle bei 24 Std, was Synchronisation auf den LD anzeigt.

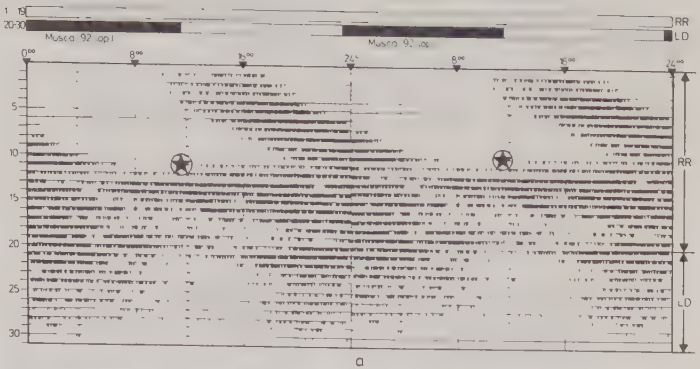
Abb. 43: Prä- und postoperative Aktivitätsmuster von individuellen Fliegen im RR und im LL (12:12). Zeitpunkt und Art der Operation ist durch ★ (Durchtrennung der optischen Trakte) und ⍟ (Lobektomie) angegeben.

a) Klare Rhythmik nach Lobektomie (⍟). Synchronisation durch LD ab dem 20. Tag mit Aktivitätsbeginn in der Mitte der Lichtphase und Aktivitätsende nach Mitternacht.

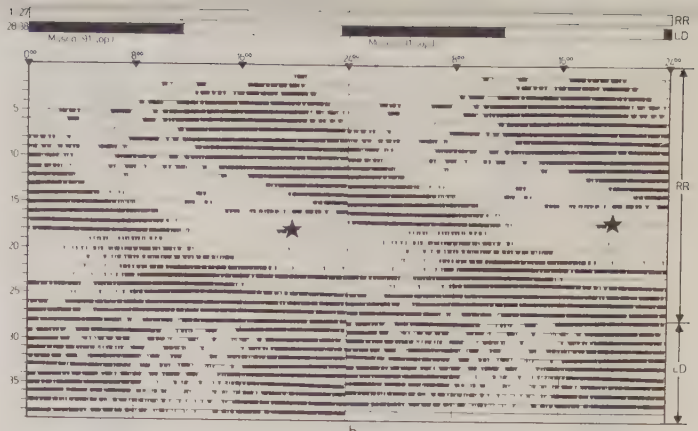
b) Komplexe Rhythmik nach Durchtrennen der optischen Trakte (★). Synchronisation durch LD ab dem 28. Tag mit ähnlicher Phasenlage wie a).

c) Arrhythmie nach Durchtrennen der optischen Trakte (★) Synchronisation durch LD ab dem 23. Tag. Der Aktivitätsbeginn ist wiederum verzögert.

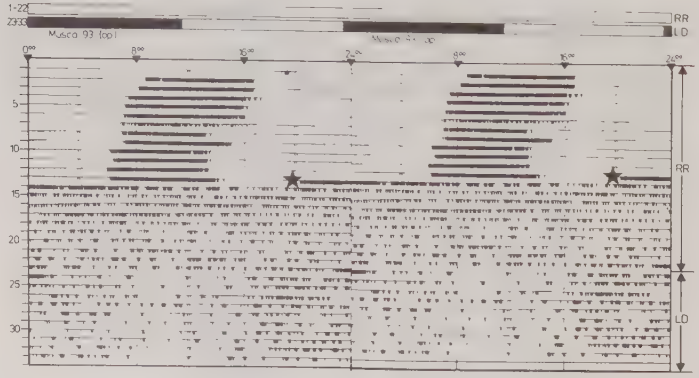
d) Hyperaktivität nach Lobektomie (⍟). Synchronisation durch LD ab dem 18. Tag.



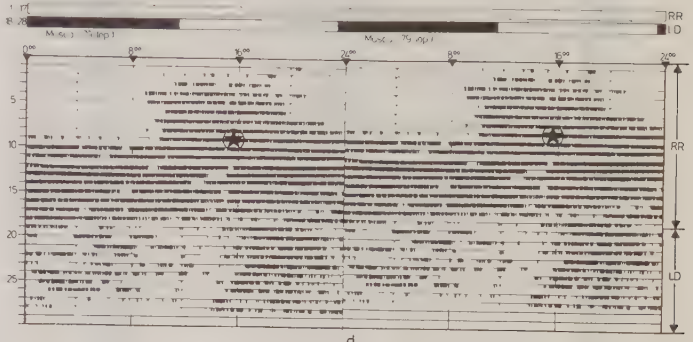
a



b



c



d

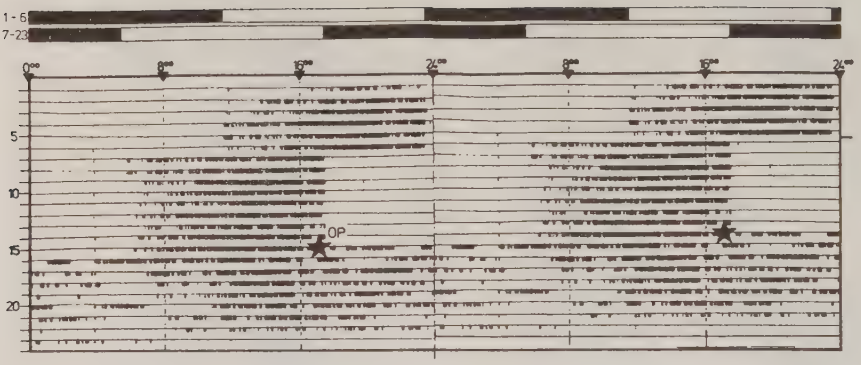


Abb. 44: Phasenverschiebung durch Vorverlegung des LD um 6 Std. (am 7. Tag). Durchtrennung der optischen Trakte (am 15. Tag) verschob die Aktivität um genau 6 Std. nach hinten.

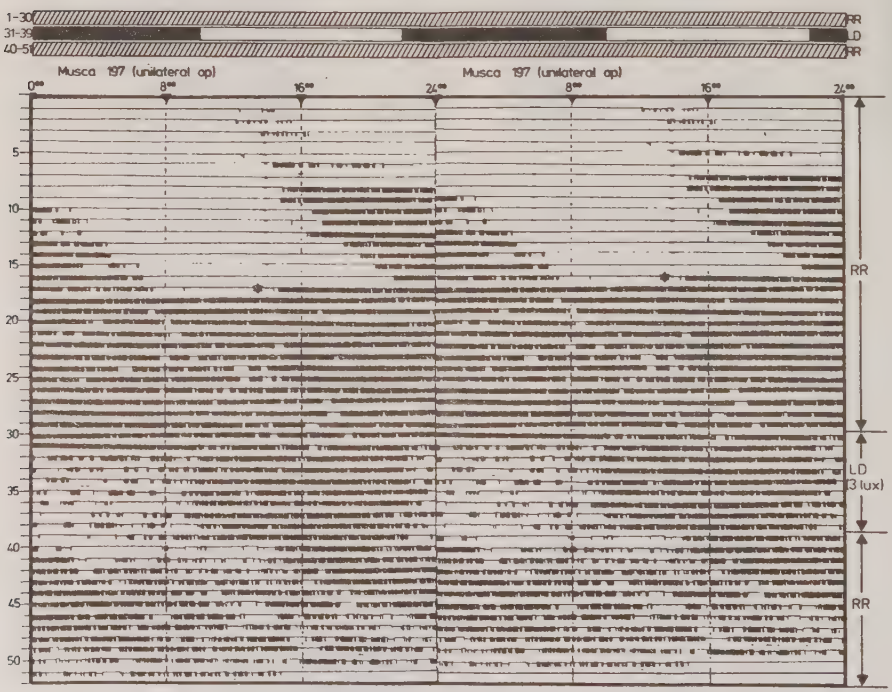


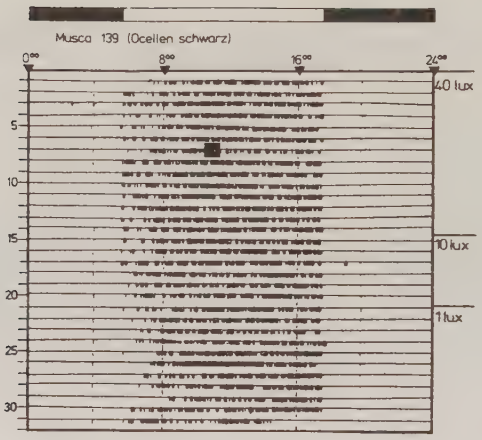
Abb. 45: Hyperaktivität nach Durchtrennung eines optischen Traktes. Durch LD wird die Fliege synchronisiert und zeigt im anschließenden RR eine deutliche, freilaufende Rhythmik.

C.2.4. Verhalten im LD nach Abdecken von Komplexaugen, Ocellen oder beidem

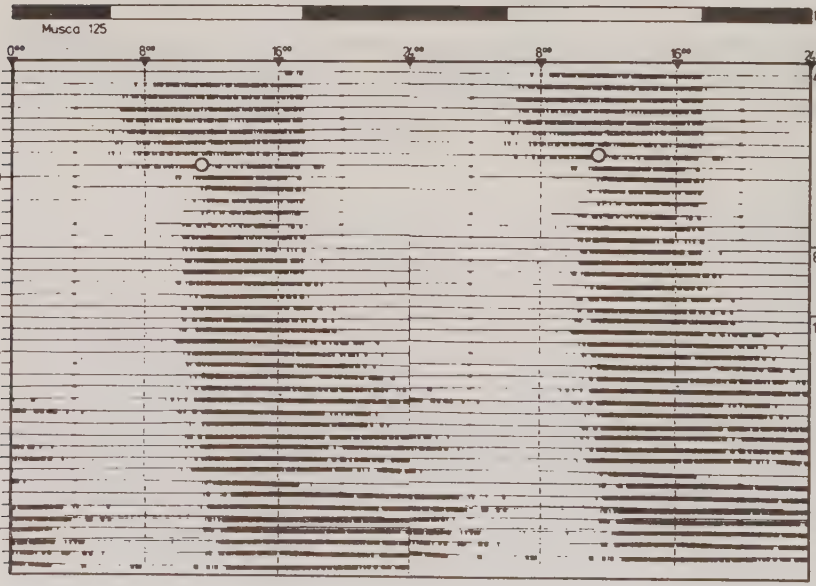
Durch Abdecken der Ocellen wurde die Aktivität der Fliegen in keiner Weise beeinflußt. Sie blieb wie vorher synchronisiert (Abb. 46a).

Nach Abdecken der Komplexaugen wurden die Fliegen erst in der zweiten Hälfte der Lichtphase aktiv. Im Gegensatz zu den Fliegen mit durchtrennten optischen Trakten stoppte die Aktivität bei 40 lux jedoch sofort mit Licht-aus. Wurde die Lichtintensität auf 1 lux herabgesetzt, dehnten die Fliegen ihre Aktivitätszeit in die Dunkelphase hinein aus und verhielten sich damit wie die operierten Fliegen bei 40 lux (Abb. 46b).

Bei 14 Fliegen wurde versucht, Komplexaugen und Ocellen abzudekken. Die spätere Kontrolle auf Dichtheit der Abdeckung ergab, daß nur bei vier Fliegen die Abdeckung vollständig war. Von ihnen zeigten drei Freilauf (Abb. 47). Alle anderen waren so synchronisiert wie nach Abdeckung der Komplexaugen allein.



a



b

Abb. 46: a) Fliege, deren Ocellen (am 7. Tag) mit schwarzem Wachs abgedeckt wurden (■), ohne Einfluß auf das Aktivitätsmuster zu haben.

b) Fliege, deren Komplexaugen (am 9. Tag) mit schwarzem Wachs abgedeckt wurden (○). Bei 40 lux beginnt die Aktivität einige Stunden nach L-an, endet aber wie zuvor mit L-aus. Bei Absenken der Lichtintensität auf 8 lux dehnt sie sich in die Dunkelphase aus, was bei 1 lux noch verstärkt wird.

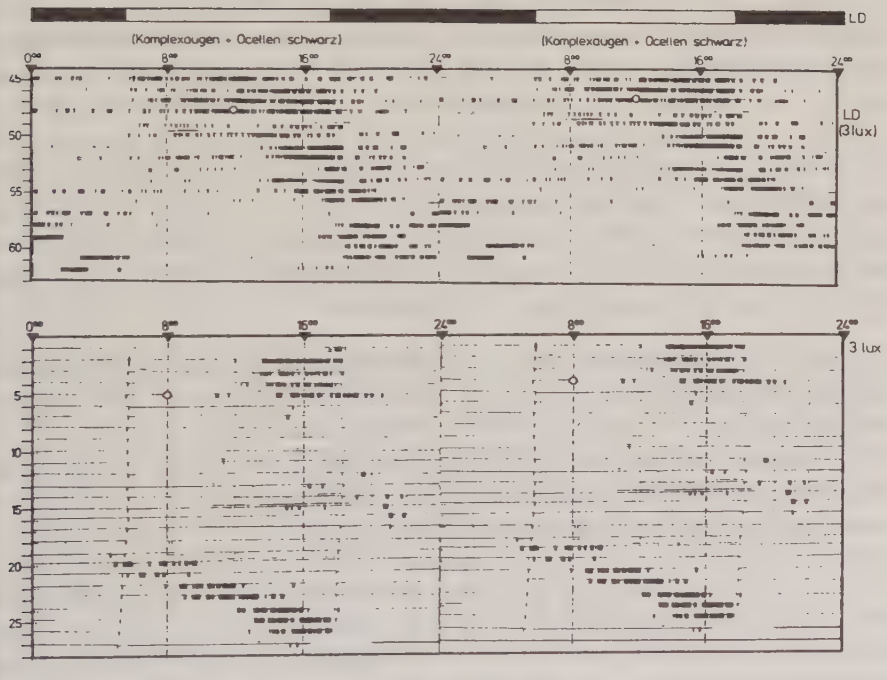


Abb. 47: Freilauf im LD nach Abdecken von Komplexaugen und Ocellen.

C.3 Diskussion

C.3.1. Charakteristika der Laufaktivitätsrhythmik von MUSCA DOMESTICA

C.3.1.1. Verhalten im RR

Im Vergleich zu DROSOPHILA (Helfrich und Engelmann, 1983) zeichnet sich MUSCA im allgemeinen durch eine sehr ausgeprägte Rhythmik aus. Aktivitäts- und Ruhephasen sind deutlich gegeneinander abgesetzt und machen die Beurteilung des Aktivitätsmusters leicht. Lediglich nach sehr langer Registrierzeit (über sechs Wochen) und kurz vor dem Tod der Tiere wurde das Aktivitätsmuster manchmal verschwommener, und es trat Hyperaktivität auf. Diese Erscheinungen sind als Alterseffekte anzusehen. Ähnliche Beobachtungen wurden neben verschiedenen Säugern bei DROSOPHILA (Mack, 1980) und AEDES (Nayar und Sauermann, 1971) gemacht.

Der Anteil rhythmischer, bzw. arrhythmischer Fliegen und solcher mit komplexer Rhythmik ist bei MUSCA ähnlich wie beim Wildtyp von DROSOPHILA.
Ungefähr die Hälfte der Tiere mit komplexer Rhythmik zeigt zwei Komponenten gleichzeitig. Damit liegt der Anteil dieser Fliegen etwas höher als bei DROSOPHILA (WT_B).

Auffällig ist, daß die meisten Fliegen mit deutlicher Rhythmik streng genommen ebenfalls zwei Komponenten zeigen, die zeitlich aufeinanderfolgen. Zunächst war die Periodenlänge < 24 Std., dann verlängerte sie sich und war > 24 Std. Dies ist ein Hinweis für eine Beteiligung von zwei Komponenten, selbst bei Fliegen mit deutlicher Rhythmik.

Die Periodenverlängerung könnte aber auch vom Alter der Fliegen abhängen. Alterseffekte dieser Art wurden für Nager beschrieben (Pittendrigh und Daan, 1976 a). Hier nahm τ systematisch im Alter ab, jedoch betrug der maximale Unterschied in der Periodenlänge 0,6 Std. Bei MUSCA beträgt der Unterschied durchschnittlich 1,5 Std.
Wenn der Übergang von kurzer zu langer Periodenlänge bei MUSCA vom Lebensalter abhinge, müßten alle älteren Tiere, die in den Versuch

genommen wurden, bereits von Anfang an die längere Periodenlänge zeigen. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Änderung in der Periodenlänge erfolgte immer eine gewisse Zeit nach dem Übergang in RR. Deshalb liegt der Periodenverlängerung eher eine Änderung im circadianen System zugrunde, die von der Zeit des Verweilens in Dauerbedingungen abhängt und ganz unabhängig vom Lebensalter ist.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei den Fliegen PHORMIA TERRAENOVAE (Saint-Paul und Aschoff,1979; Aschoff und Saint-Paul,1982) und CALLIPHORA STYGIA (Waddel, 1984) gemacht.

Die Periodenlängen der beiden zeitlich aufeinanderfolgenden Komponenten sind mit τ_1 = 23,1 Std. und τ_2 = 24,7 Std. etwas verschieden von τ_1 = 21,9 Std. und τ_2 = 25,4 Std. der Fliegen, die zwei Komponenten gleichzeitig zeigen. Die Differenz zwischen der kurzen und langen Periodenlänge ist bei den letzteren größer.

Dies ist zu erwarten, wenn man annimmt, daß bei den Fliegen mit komplexer Rhythmik beide Komponenten voneinander entkoppelt sind und jeweils ihre spezifische Periodenlänge ausprägen. Bei den Fliegen, die beide Komponenten zeitlich getrennt voneinander ausprägen, bleiben sie dagegen stets gekoppelt. Das System ist jedoch so variabel, daß einmal die eine und einmal die andere dominiert. Da beide miteinander in Wechselwirkung stehen, kommt nie die Periodenlänge einer Komponente voll zur Ausprägung.

Die Änderung der Periodenlänge kann also auf die gegenseitige Wechselwirkung eines Zwei-Komponentensystems, welches die Laufaktivität kontrolliert, zurückgeführt werden.
Auch die biphasische Aktivität von Fliegen kann so erklärt werden. Hier wären die beiden Komponenten gekoppelt, aber leicht außer Phase (vgl. Zwei-Oszillatorenmodell von Wiedenmann, 1980).

Da es bei MUSCA neben Fliegen mit zwei Komponenten auch solche mit mehreren Komponenten gibt, ist anzunehmen, daß das circadiane System wie bei DROSOPHILA (Helfrich und Engelmann, 1983) aus vielen Einzeloszillatoren besteht, die jedoch zu zwei übergeordneten Gruppen zusammengefaßt sind. Ganz ähnliche Überlegungen wurden zur Erklärung des MUSCA ähnelnden Aktivitätsmusters von

CALLIPHORA STYGIA herangezogen (Waddel, 1984).

C.3.1.2. Verhalten im DD und LL

Im DD war τ etwas kürzer als im RR. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen von Mack (1980) an DROSOPHILA und von Waddel (1984) an CALLIPHORA.

Das Verhalten von MUSCA im LL ist ähnlich dem anderer Dipteren (Mack, 1980; Waddel, 1984) und unterscheidet sich damit von dem anderer Insekten. Während bei diesen die circadiane Rhythmik bei höheren Intensitäten allmählich ausdämpft, wird MUSCA bereits bei sehr niedrigen Lichtintensitäten arrhythmisch und hyperaktiv. So waren bei 1,8 lux bereits 81,3 % der Fliegen arrhythmisch. Gut die Hälfte davon war hyperaktiv. Dies stimmt mit Beobachtungen von Tsutsumi (1973) überein.
Es scheint eine kausale Verbindung zwischen Licht und Aktivität zu bestehen. Man könnte fast vermuten, daß Licht einen Maskiereffekt auf die Laufaktivitätsrhythmik ausübt (Truman, 1972), während das zugrundeliegende circadiane System freiläuft: Im Licht wird immer die Möglichkeit, aktiv zu sein, wahrgenommen.
Um dies zu testen, wurden Versuche mit noch niedrigeren Lichtintensitäten gemacht. Der Maskiereffekt sollte bei einer kritischen Intensität verschwinden und die tatsächliche Rhythmik erkennbar sein. Dies war auch der Fall, jedoch war die Rhythmik nicht, wie erwartet, deutlich, sondern es traten signifikant mehr Tiere mit komplexer Rhythmik auf als im RR.

Das circadiane System von MUSCA scheint also im LL weniger stabil zu sein als im RR und häufiger in seine Einzelkomponenten aufzuspalten. Diese beobachteten Änderungen im Aktivitätsmuster können nicht allein auf einen Maskiereffekt des Lichtes zurückgeführt werden. Dieser mag sicher bei der erhöhten Aktivität der Tiere mitspielen, aber das Auftreten von mehreren Komponenten liegt eher im circadianen System selbst.

Das Licht hat demnach zwei voneinander unabhängige Wirkungen:
Erstens erhöht es den Aktivitätsspiegel und zweitens hat es eine destabilisierende Wirkung auf das circadiane System.

Die destabilisierende Wirkung könnte auf einer Schwächung der Kopplung zwischen den Oszillatorgruppen (bzw. Einzeloszillatoren) beruhen.
Bei herabgesetzter Kopplung sollte es zunächst (bevor die Einzeloszillatoren entkoppeln) zu Periodenlängenveränderungen kommen (Enright, 1980; Christensen und Lewis, 1982; 1983). Dies wurde tatsächlich beobachtet: War im LL noch eine deutliche Rhythmik zu erkennen, so schwankte deren τ in der Regel, außerdem unterschied sich τ_{LL} signifikant von τ_{RR}. Die meisten Fliegen verlängerten τ im LL. Dies steht im Einklang mit Befunden an DROSOPHILA (Mack, 1980) und CALLIPHORA (Waddel, 1984) und widerspricht der Aschoff-Regel.

Einige Fliegen verkürzten τ jedoch im LL.

Eine herabgesetzte Kopplung zwischen Einzeloszillatoren würde demnach bei den meisten Fliegen eine Periodenverlängerung bewirken und bei wenigen eine Periodenverkürzung zur Folge haben. Das Licht könnte natürlich auch die Stärke der Oszillatorgruppen (oder Einzeloszillatoren) ändern. Bei den meisten Tieren würde dann im LL die Komponente mit langem τ verstärkt, bei den anderen die mit kurzem τ.

Läßt man alle Spekulationen beiseite, bleibt eines:
Die Beobachtungen lassen sich leichter mit einem Oszillatorsystem, das aus mehreren Einzelkomponenten besteht, erklären, als mit einem einzigen Pacemaker, der die Laufaktivitätsrhythmik steuert.

Die im LL gehäuft auftretende Arrhythmie wäre dann die Folge von entkoppelten, asynchron schwingenden Einzeloszillatoren und nicht auf einen einzigen stillstehenden Pacemaker zurückzuführen.

Die experimentelle Unterscheidung erscheint jedoch schwierig, denn beide Systeme würden sich nach dem Übergang von LL in RR gleich verhalten:

- Der Pacemaker wird durch L-aus wieder in Gang gesetzt und hat stets die gleiche charakteristische Phasenbeziehung zum L-aus.

- Die asynchron schwingenden Einzeloszillatoren werden durch L-aus wieder synchronisiert und der daraus resultierende Rhythmus

sollte wiederum bei allen Fliegen die gleiche Phasenbeziehung zum L-aus haben.

Tatsächlich hatte die Rhythmik aller im LL arrhythmischen Fliegen im folgenden RR die gleiche Phasenbeziehung zu L-aus.

Dagegen verursachte der Wechsel von LL in RR bei Fliegen mit deutlicher Rhythmik im LL keine Phasenverschiebungen. Nur die Periodenlänge und eventuell das Aktivitätsmuster wurden verändert.

C.3.1.3. Verhalten im LD und in Temperaturzyklen

MUSCA DOMESTICA ist tagaktiv und frühere Beobachtungen zeigten im LD entweder ein unimodales oder ein bimodales Aktivitätsmuster (Parker, 1962; Tsutsumi, 1973). Bei den Freilandversuchen von Parker hatten nur die männlichen Tiere ein bimodales Aktivitätsmuster, die weiblichen zeigten einen einzigen Aktivitätsgipfel. Ein solcher geschlechtsbedingter Unterschied wurde in den hier gemachten Versuchen nicht gefunden. Dies könnte an den unterschiedlichen Versuchsbedingungen liegen.

Die meisten Fliegen (~85 %) hatten im LD ein unimodales Aktivitätsmuster, wobei die Aktivität in der Regel mit L-an begann und mit L-aus stoppte. Die übrigen Fliegen (~15 %) zeigten Bimodalität, jedoch nie so ausgeprägt wie DROSOPHILA.
Dies gilt für Lichtintensitäten von 40 bis 1 lux. Bei Herabsenken der Lichtintensität auf 3×10^{-3} lux waren alle Fliegen unimodal aktiv, wobei das Aktivitätsband schmaler wurde. Meistens fehlte die Aktivität nach L-an. Außerdem war häufig nur ein Teil der Aktivität synchronisiert, während der andere freilief. Dies könnte wieder auf die Beteiligung von zwei Komponenten am circadianen System hindeuten:
Eine sehr lichtempfindliche Komponente, die für die Aktivität gegen Ende der Lichtperiode verantwortlich ist und wahrscheinlich ein $\tau < 24$ Std. hat und eine weniger lichtempfindliche Komponente, die die Aktivität unmittelbar nach L-an steuert und sich bei niedriger Lichtintensität nach hinten verschiebt, wobei sie mit der Abendkomponente verschmilzt und schließlich mit $\tau > 24$ Std. freiläuft.

Damit ergeben sich gewisse Parallelitäten mit dem "morning" und "evening" - Oszillatormodell für nachtaktive Säuger (Pittendrigh und Daan, 1976 b):
"Morning" und "evening" - Oszillator reagieren unterschiedlich auf Licht: Die Periodenlänge des "morning" - Oszillators (= Abend-Oszillator eines tagaktiven Tieres) ist μ 24 Std. und wird bei zunehmender Lichtintensität verkürzt, die des "evening" - Oszillators (= Morgen-Oszillator eines tagaktiven Tieres) ist dagegen > 24 Std. und wird im LL verlängert.

Ähnliches könnte bei MUSCA gelten. Im LD würde der Abend-Oszillator dominieren, während unter Freilaufbedingungen normalerweise der Morgen- Oszillator die Oberhand behält. Er wird im LL verlängert, was bei den meisten Tieren beobachtet wurde. In den seteneren Fällen, bei denen τ im LL verkürzt wird, könnte dies auf einen stärkeren Abendoszillator zurückzuführen sein, der sich im LL verkürzt.

Vergleicht man die Synchronisation im LD (1 - 40 lux) mit der durch Temperaturzyklen, so fällt auf, daß die Temperatur kein so starker Zeitgeber zu sein scheint wie das Licht.
Die Tiere waren zwar bevorzugt in der Warmperiode aktiv, aber auch in der Kaltperiode trat noch viel Aktivität auf. Außerdem gab es manchmal unterschwellig freilaufende Komponenten, und es dauerte sehr lange, bis Synchronisation eintrat, wenn die Fliegen anfangs außer Phase mit dem Temperaturzyklus waren. Manche Fliegen wurden überhaupt nicht synchronisiert. Dagegen erfolgte die Synchronisation auf einen LD wie bei DROSOPHILA ohne nennenswerte Transients und selbst bei 3×10^{-3} lux waren alle Fliegen zumindest zeitweise synchronisiert.

C.3.2. Laufaktivität von operierten Fliegen

C.3.2.1. Bedeutung der optischen Ganglien für die Laufaktivitätsrhythmik von MUSCA DOMESTICA

Bei DROSOPHILA scheinen die optischen Ganglien für die Rhythmik entbehrlich zu sein. Da die Mutanten jedoch noch geringe Reste der optischen Ganglien besitzen, ist diese Aussage nicht ganz sicher.

Die Operationen bei MUSCA wurden durchgeführt, um endgültig zu klären, ob die optischen Ganglien notwendig zum Aufrechterhalten der Laufaktivitätsrhythmik sind.

Dies ist sicherlich nicht der Fall. Da 50 % der Fliegen mit vollständig durchtrennten optischen Trakten klare postoperative Rhythmen haben, ist es sehr unwahrscheinlich, daß die Pacemaker für die Laufaktivitätsrhythmik in den optischen Ganglien liegen. Mit Sicherheit ist die Rhythmizität nicht auf neurale Verbindungen zwischen den optischen Ganglien und dem Zentralgehirn angewiesen, wie es bei Schaben (Page, 1983) und Grillen (Tomioka und Chiba, 1984) der Fall ist.

Da die optischen Ganglien neurosekretorische Zellen enthalten (Köpf, 1957; Thomsen, 1965; Rensing, 1966 a; vgl. mit Ergebnissen bei DROSOPHILA), kann eine humorale Verbindung nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde Lobektomie versucht. Wiederum waren 50 % der Tiere nach der Operation noch rhythmisch. Leider war die Lobektomie nie vollständig. Teile der optischen Ganglien waren stets noch vorhanden. Allerdings waren diese stark degeneriert, und es ist kaum vorstellbar, daß sie noch funktionsfähige neurosekretorische Zellen enthielten. So konnten die betreffenden neurosekretorischen Zellen nach Durchtrennen der optischen Trakte mit Paraldehydfuchsin nicht nachgewiesen werden, während dies bei nicht operierten Fliegen gelang (Helfrich und Cymborowski, unveröffentlicht). Es ist anzunehmen, daß sie durch die Operation zerstört wurden.

Die Pacemaker für die Laufaktivitätsrhythmik scheinen also im Zentralgehirn zu liegen.
Um sie näher zu lokalisieren, wurde versucht, das postoperative Verhalten der Fliegen mit der Histologie des Gehirns zu korrelieren. Die meisten arrhythmischen Fliegen hatten "vakuolisierte" Regionen im Zentralgehirn. Jedoch war eine genauere Einengung der für die Rhythmik wichtigen Regionen nicht möglich, da die Degenerationen in ihrer Lage sehr variabel waren. Wahrscheinlich sind sie eher auf eine Zerstörung des Tracheensystems zurückzuführen als auf die Durchtrennung der optischen Trakte selbst. Je nachdem, welche Tracheen getroffen wurden, konnten unterschiedliche Ge-

hirnbereiche nicht mehr mit Sauerstoff versorgt werden und degenerierten. Das könnte auch erklären, warum manche Fliegen mit unvollständigen Schnitten und sogar ein scheinoperiertes Tier degenerierte Regionen aufwiesen. Ebenso kann die Zerstörung von Teilen des Tracheensystems Regenerationen der optischen Trakte verhindert haben. Regeneration der Verbindungen zwischen optischen Ganglien und dem Zentralgehirn wurden bei Schaben (Page, 1983) und Grillen (Tomioka und Chiba, 1984) beobachtet, bei MUSCA jedoch nie.

Um sicher zu gehen, daß die Färbe- und Fixierprozeduren nicht die Ursache der beobachteten Vakuolen waren, wurden Gehirne sofort nach der Durchtrennung beider optischer Trakte der gleichen Behandlung unterzogen. Vakuolisierte Regionen wurden bei ihnen nicht beobachtet. Deshalb dürften die Vakuolen tatsächlich auf Degenerationen zurückzuführen sein, die im Laufe der Zeit nach der Operation erfolgten.

Ähnlich wie bei DROSOPHILA sind die optischen Ganglien bei MUSCA nicht der Sitz von Pacemakern, aber anscheinend spielen sie dennoch eine Rolle im circadianen System der Fliegen. Diese Schlußfolgerung basiert auf postoperativen Veränderungen im Verhalten von operierten Stubenfliegen:

- Es tritt komplexe Rhythmik auf,
- die Periode wird länger,
- der Aktivitätsspiegel wird erhöht.

Auftreten von komplexer Rhythmik nach der Operation

Das postoperative Aktivitätsmuster einiger Fliegen war aus mehreren Komponenten zusammengesetzt. Im Gegensatz zu DROSOPHILA waren jedoch nur selten genau zwei Komponenten - eine mit langer und eine mit kurzer Periodenlänge - zu erkennen. Die Periodogrammanalyse ergab zwei bis vier Rhythmen und die optische Beurteilung war wesentlich schwieriger als bei DROSOPHILA. Das lag zum Teil an der hohen postoperativen Aktivität, die die vorhandene Rhythmik verschleierte.
Trotz alldem unterstützt das Auftreten mehrerer Komponenten die Hypothese, daß die Laufaktivität von mehren Oszillatoren gesteuert

wird und daß die optischen Ganglien eine Rolle in der Kopplung zwischen ihnen spielen.

Periodenverlängerung

Periodenverlängerungen wurden nach allen operativen Eingriffen gefunden.
Bei lobektomierten Fliegen war die Periodenverlängerung (+ 1,23 Std.) fast doppelt so groß wie bei Fliegen mit durchtrennten optischen Trakten, und diese war wiederum doppelt so groß wie die durch Scheinoperationen hervorgerufene Periodenverlängerung (+ 0,66 Std.). Es scheint also eine leichte Korrelation zwischen dem Ausmaß der Zerstörung und der Periodenverlängerung zu bestehen. Jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant. Außerdem wurden Periodenverlängerungen sogar nach Lichtpulsen beobachtet (+ 0,32 Std.).

Aschoff (1979) fand bei Vertebraten Periodenveränderungen nach Lichtpulsen. Die Periode wurde nach Lichtpulsen, die "delays" hervorriefen, verlängert, und bei solchen, die "advances" bewirkten, verkürzt. Im Falle von MUSCA wurde die Periode unabhängig davon, ob die Störungen "delays" oder "advances" bewirkten, stets verlängert.

Page et al. (1977) fanden Periodenverlängerung nach Zerstörung einer Lobula. Sie erklärten dies mit der gegenseitigen Kopplung beider in den Lobulae liegenden Pacemaker. Die Periodenlänge der beiden gekoppelten Pacemaker sollte kürzer sein, als die der beiden Einzelpacemaker.
Die optischen Ganglien könnten eine Rolle in der Kopplung von Oszillatoren spielen, die im Gehirn liegen, wie bereits für DROSOPHILA diskutiert wurde. Allerdings müßte dann die Kopplung bereits durch Lichtpulse geschwächt werden, da auch nach Lichtpulsen Periodenverlängerungen auftraten.

Anstieg des Aktivitätsspiegels

Der Aktivitätsspiegel war bei operierten Fliegen signifikant erhöht, während nach Scheinoperationen keine erhöhten Aktivitätsspiegel auftraten.

Ein Aktivitätsanstieg wurde bei mehreren Insektenarten nach verschiedenen operativen Eingriffen beobachtet (Brady, 1967 a, b; Nishiitsutsuji-Uwo und Pittendrigh, 1968 b; Cymborowski, 1973).
Bei Grillen schien eine Störung der normalen Funktion von neurosekretorischen Zellen dafür verantwortlich zu sein (Cymborowski, 1983). Neurosekretorische Produkte haben auch bei anderen Arten einen entscheidenden Einfluß auf den Aktivitätsspiegel (Haskell und Moorhouse, 1963; Brady 1967 a). Bei PERIPLANETA AMERICANA vermindern Extrakte aus der Corpora cardiaca nicht nur die Laufaktivität, sondern es konnte durch sie auch deutlich die spontane elektrische Aktivität isolierter Nervenstränge in vitro herabgesetzt werden (Özbas und Hodgson, 1958). Die Corpora cardiaca gelten als Speicherorgane für Neurosekrete aus der Pars intercerebralis (Scharrer, 1952).
Es ist möglich, daß bei MUSCA die Durchtrennung der optischen Trakte eine Störung im neurosekretorischen System bewirkte, wodurch der hemmende Einfluß der Neurosekrete wegfiel.

Andererseits haben die optischen Ganglien Verbindung zu den Pilzkörpern (Brady, 1971): Von der Medulla ziehen Nerven zur Calyx und vom Lobulakomplex zum - und -Lobus der Pilzkörper. Die Pilzkörper wiederum innervieren Unterschlundganglion und Zentralkomplex. Nach Roeder (1967) und Huber (1965) haben Unterschlundganglion und Zentralkomplex einen erregenden Einfluß auf die Bewegungsaktivität. Beide werden von den Pilzkörpern gehemmt. Die optischen Ganglien könnten also die Aktivität über die Pilzkörper steuern (Brady, 1971). Fällt die Innervation der Pilzkörper durch die optischen Ganglien (nach Durchtrennung der optischen Trakte) weg, haben diese keinen hemmenden Einfluß mehr auf Unterschlundganglion und Zentralkomplex. Die Tiere wären folglich hyperaktiv.

Ob eine dieser beiden Erklärungsmöglichkeiten für die Hyperaktivität richtig ist, und wenn ja, welche, kann nur durch weitere

Experimente geklärt werden.

Hyperaktivität ist nicht mit Arrhythmie gleichzusetzen. In vielen Fällen hat es den Anschein, als ob eine vorhandene Rhythmik durch die Hyperaktivität verdeckt wird. Hinweise daraufhin geben hyperaktive Tiere, die durch einen LD synchronisiert wurden und anschließend eine deutliche Rhythmik zeigten. Es ist durchaus möglich, daß nach längerer Zeit die Pilzkörper oder die neurosekretorischen Zellen ihre hemmende Funktion wieder aufnehmen. Sicher zu erwarten ist dies bei den einseitig operierten Tieren, da hier eine Gehirnhälfte noch funktionsfähig ist. Bei diesen wurde eine Abnahme der Aktivität nach längerer Zeit auch am häufigsten beobachtet.

C.3.2.2. Fotorezeption und Synchronisation bei blinden Fliegen

Im Gegensatz zu DROSOPHILA PSEUDOOBSCURA (Mack, 1980) scheint das circadiane System von MUSCA sehr lichtempfindlich zu sein:
Nach einem fünfminütigen Weißlichtpuls wurden Phasenverschiebungen von bis zu 12 Stunden gefunden, sowohl "delays" als auch "advances". Eine vorläufige Phasenresponsekurve ist in Abb. 40 dargestellt.

Wie bereits beschrieben, sind die Tiere im LD während der Lichtphase aktiv und ihr Aktivitätsband könnte aus zwei Komponenten zusammengesetzt sein: einer weniger lichtempfindlichen Komponente, die den ersten Teil der Aktivität bildet, und einer sehr lichtempfindlichen Komponente, die den zweiten Teil der Aktivität bildet (vgl. "Verhalten im LD" C.3.1.3.).

Um Aufschluß über die Fotorezeptoren für die Laufaktivitätsrhythmik zu bekommen, wurden Ocellen, Komplexaugen oder beides mit schwarzem Wachs abgedeckt. Bei Abdecken von Ocellen und Komplexaugen zeigten die Tiere, deren Abdeckung vollständig und dick genug war, Freilauf. Dies zeigt erstens, daß die Synchronisation nicht durch Strahlungswärme des Lichtes erfolgte und zweitens, daß die Fotorezeptoren im Kopf liegen.

Bei Abdecken der Ocellen änderte sich das Synchronisationsmuster nicht. Damit sind die Ocellen wie bei DROSOPHILA für die Synchronisation unbedeutend.

Bei Abdecken der Komplexaugen verschwand der Aktivitätsteil nach L-an, der zweite Aktivitätsteil blieb synchronisiert. Das Verhalten der Fliegen stimmt somit mit dem von normalen Fliegen in sehr schwachem LD überein: Die weniger lichtempfindliche Komponente verschwindet, die andere bleibt.

Gleichzeitig bedeutet dies, daß die Komplexaugen nicht die entscheidenden Fotorezeptoren für die Laufaktivitätsrhythmik sind. Sie scheinen jedoch Licht zu einem Fotorezeptor im Zentralgehirn zu leiten und so die Lichtmenge, die auf ihn trifft, zu erhöhen. Die für den Aktivitätsteil nach L-an verantwortliche Komponente scheint dieses zusätzliche Licht zur Synchronisation zu benötigen.

Das Verhalten von operierten Fliegen im LD führt zum gleichen Ergebnis.
Operierte Fliegen mit vollständig durchtrennten optischen Trakten begannen mit ihrer Aktivität um die Mittagszeit, wie die Fliegen mit abgedeckten Komplexaugen. Sie dehnten die Aktivität jedoch in die Dunkelperiode aus (vgl. mit DROSOPHILA). Damit hatten sie ein breiteres Aktivitätsband als die Fliegen mit abgedeckten Komplexaugen. Dies mag seinen Grund in einer geschwächten Kopplung zwischen normalerweise eng gekoppelten Oszillatoren haben. Eine enge Kopplung resultiert in einem schmalen Aktivitätsband. Bei Lockerung der Kopplung sollte das Aktivitätsband breiter werden. Bei noch stärkerer Abschwächung der Kopplung sollten sich einzelne Komponenten abspalten.
Genauso kann auch das Synchronisationsmuster der blinden Doppelmutanten von DROSOPHILA erklärt werden. Da die Cuticula von DROSOPHILA wesentlich lichtdurchlässiger ist als die von MUSCA, spielen erwartungsgemäß die Komplexaugen keine so große Rolle in der Erhöhung der Lichtmenge, die auf den Fotorezeptor trifft. Aus diesem Grund zeigt so stets die Aktivität bei L-an und die Doppelmutanten prägen sie bei höheren Lichtintensitäten aus.

Ein Breiterwerden des Aktivitätsbandes wurde auch bei einigen Stubenfliegen mit abgedeckten Komplexaugen gefunden, als die

Lichtintensität vermindert wurde. Unter diesen Umständen ist der Zeitgeber anscheinend nicht stark genug, alle Komponenten des Oszillatorsystems zu synchronisieren. Ähnliches und sogar interne Desynchronisation (Abspaltung einer Komponente) wurde bereits für normale Fliegen bei extrem schwacher Lichtstärke beschrieben.

Das wichtigste Ergebnis der Synchronisationsversuche bleibt jedoch, daß sich alle Fliegen mit durchtrennten optischen Trakten synchronisieren ließen, was für einen extraocularen Fotorezeptor spricht.

Interessant ist, daß auch postoperativ hyperaktive und arrhythmische Fliegen synchronisiert wurden. Da auch hier die Aktivität das oben beschriebene charakteristische Aktivitätsmuster im LD hatte, ist es unwahrscheinlich, daß es sich um eine exogene Reaktion auf Licht handelte, sondern deutet auf eine endogene Uhr hin. Wenn das richtig ist, besäßen auch arrhythmische Fliegen noch eine "innere Uhr". Jedoch wäre ihre Amplitude nicht groß genug, um im RR eine klare Rhythmik zu zeigen. Oder die innere Kopplung zwischen den Oszillatoren ist nicht stark genug, um unter Dauerbedingungen eine Rhythmik aufrechtzuerhalten (vgl. Arrhythmie bei per^0).

D. VERSUCHE MIT CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

D.1. Material und Methoden

Es wurde die Laufaktivität von CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA nach der bereits für MUSCA beschriebenen Methode im RR bei 20° C aufgezeichnet.
Die Versuchstiere wurden im LD 16:8 bei 25°C gezüchtet und waren fünf Tage alt, als der Versuch begann.

D.2. Ergebnisse

CALLIPHORA erwies sich als wesentlich träger als MUSCA, und viele Fliegen waren fast ganz inaktiv, so daß über ihre Rhythmik keine Aussage gemacht werden konnte. Insgesamt konnte die Rhythmik von 25 Fliegen beurteilt werden.
Davon hatten 32 % eine Rhythmik mit konstant bleibender Periodenlänge, 64 % hatten eine komplexe Rhythmik und 4 % waren arrhythmisch.

Fliegen mit klarer Rhythmik

87,5 % hatten eine Rhythmik mit kurzem τ (23,0 ± 0,15 Std.)(Abb. 48 a);
12,5% hatten eine Rhythmik mit langem τ (26,0 ± 0,00 Std.) (Abb. 48 b).

Fliegen mit komplexer Rhythmik

Bei 31,3 % der Fliegen schwankte die Periodenlänge um 24 Std. herum, 68,7 % zeigten 2 Komponenten; dabei überwog meistens die kurze Periodenlänge (54,5 %), selten die lange (9,1 %) und manchmal traten beide in alternierender Reihenfolge auf (27,3 %). Wenige Tiere zeigten Splitting in zwei Komponenten, die zueinander eine Phasenbeziehung von 180° einhielten (9,1 %). Abb. 49 zeigt Beispiele für komplexe Rhythmen.

Arrhythmische Fliegen

Die arrhythmischen Fliegen zeigten durchschnittliche Aktivität.

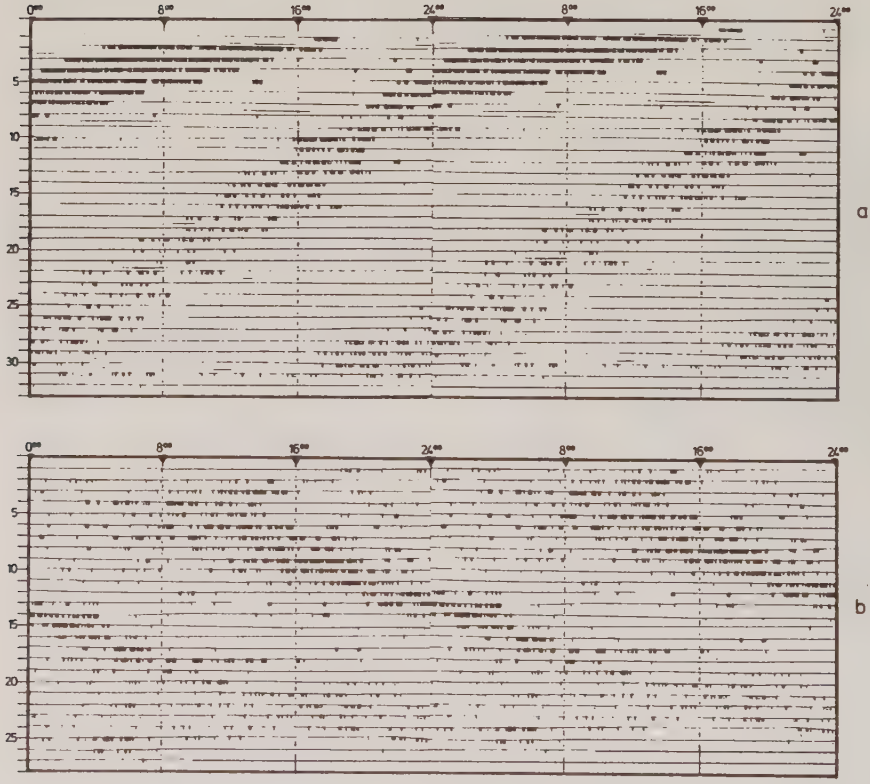


Abb. 48: Freilauf von CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA im RR.
a) τ = 23 Std.
b) τ = 26 Std.

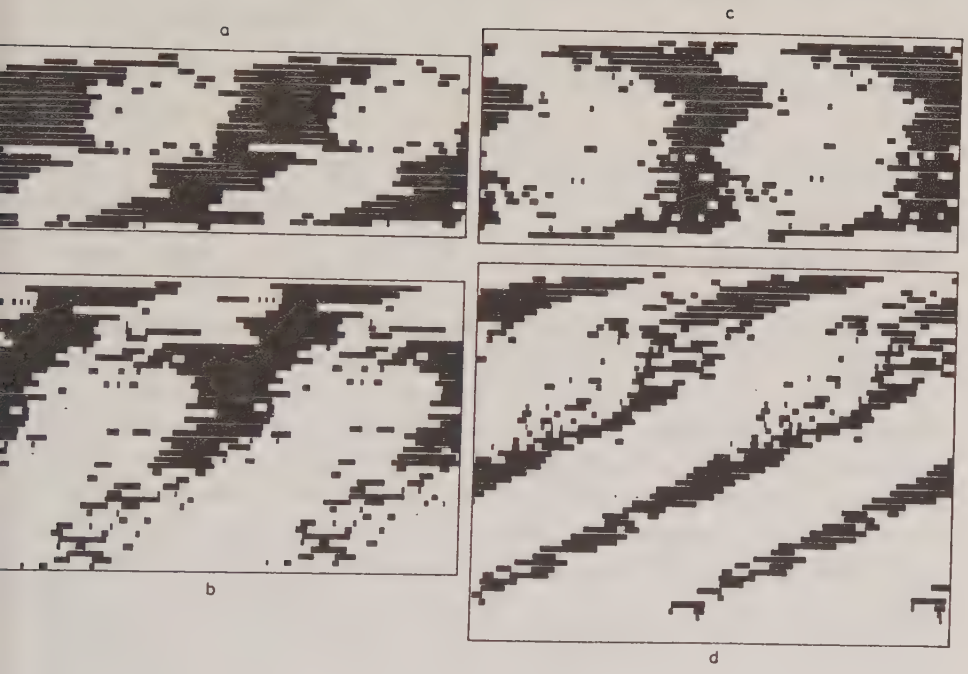


Abb. 49: Beispiele für das Auftreten von zwei Komponenten bei CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA.

a), b) Die Komponente mit kürzerem τ dominiert; die längere kommt unterschwellig an den Schnittpunkten beider Komponenten zur Ausprägung.
c) Beide Komponenten alternieren miteinander.
d) Es tritt vorübergehend "splitting" auf.

D.3. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß auch bei CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA zwei Komponenten mit unterschiedlicher Periodenlänge eine entscheidene Rolle im circadianen System zu spielen scheinen. Ähnliches wurde für CALLIPHORA STYGIA beobachtet (Waddel, 1984).

In der folgenden "Allgemeinen Diskussion" soll unter anderem etwas näher auf diese Beobachtungen eingegangen werden.

E. ALLGEMEINE DISKUSSION

E.1. Lokalisation des Laufaktivitätsoszillators

Die Tatsache, daß einzelne eukaryotische Zellen autonome circadiane Pacemaker beinhalten können, wirft Fragen über die zeitliche Organisation von Vielzellern auf:

- Ist ihre Rhythmizität auf eine oder wenige Zellen zurückzuführen, die als Pacemaker agieren und die Rhythmizität auf andere Gewebe übertragen?

- Oder ist der Organismus eine Population aus autonomen zellulären Pacemakern?

Die Lösung dieser Fragen hängt von der anatomischen Lokalisation spezifischer Pacemaker ab.

Einige Pacemaker wurden bereits im Nervensystem verschiedener Tiere gefunden:
Im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) bei Säugern (Stephan und Zucker, 1972; Stetson und Watson-Whitmyre, 1976; Moore und Eichler, 1972), im Auge von APLYSIA (Jacklet, 1969) und BULLA (Block und Wallace, 1982) und in den optischen Ganglien von manchen Insekten (Nishiitsutsuji-Uwo und Pittendrigh, 1968 a, b; Roberts, 1974; Sokolove, 1975; Page, 1978, 1983; Lukat und Weber, 1979; Loher, 1972; Sokolove und Loher, 1975; Wiedenmann, 1985; Tomioka und Chiba, 1982, 1984; Balkenohl und Weber, 1981; Fleissner, 1982; Koehler und Fleissner, 1978) oder im Zentralgehirn von anderen (Azaryan und Tyshchenko, 1970; Tyshchenko, 1973; Cymborowski, 1973, 1981; Truman, 1974; Chiba und Kasai, 1984; Handler und Konopka, 1979).

Das Ziel dieser Arbeit war, zu klären, ob die optischen Ganglien der Dipteren DROSOPHILA MELANOGASTER und MUSCA DOMESTICA Pacemaker für die Laufaktivitätsrhythmik enthalten.

Die optischen Ganglien erwiesen sich in beiden Fällen als entbehrlich für das Vorhandensein der Rhythmik.

Jedoch zeigte sich im Laufe der Untersuchungen, daß das circadiane System dieser Dipteren nicht so einfach aufgebaut war, wie zunächst angenommen:
Neben Tieren mit klarer Rhythmik und konstanter Periodenlänge gab es auch solche, die simultan zwei oder mehrere freilaufende Komponenten im Aktivitätsmuster zeigten. Splitting in zwei Komponenten wurde beobachtet und beträchtliche Periodenlängenveränderungen traten spontan oder nach Störungen auf.
Diese Erscheinungen waren einfacher durch die Beteiligung von mehreren Oszillatoren an der Steuerung der Laufaktivitätsrhythmik zu erklären als durch einen einzigen zentralen Pacemaker.

In das Zusammenspiel dieser Oszillatoren schienen die optischen Ganglien einzugreifen:

Bei den DROSOPHILA-Mutanten mit stark reduzierten optischen Ganglien und den Stubenfliegen mit durchtrennten optischen Trakten war der Anteil der Fliegen mit mehreren simultanen Rhythmen signifikant erhöht. Die Stabilität des Gesamtsystems schien also herabgesetzt zu sein. Als plausibelste Erklärung hierfür wurde angenommen, daß die Kopplung zwischen den Einzeloszillatoren geschwächt war. Dabei ist unklar, ob das System gestört ist, weil die optischen Ganglien eine entscheidende Rolle bei der Kopplung von Einzeloszillatoren spielen oder weil das Gehirn duch die fehlenden optischen Ganglien verkleinert ist.
Die zweite Erklärung impliziert, daß das Gehirn als Gesamtheit die Laufaktivitätsrhythmik steuert. Die Ausprägung der Rhythmik hinge somit vom Volumen des noch vorhandenen unbeschädigten Gehirns ab. Dies könnte erklären, warum komplexe Rhythmen mit zunehmender Reduktion des Gewebes der optischen Ganglien häufiger wurden.
Allerdings müßte man dann ähnliche Effekte bei Entfernung beliebiger anderer Gehirnteile bekommen.
Die existierende Literatur über operative Eingriffe belegt dies jedoch kaum. Über Veränderungen im rhythmischen Muster wurde nur nach Zerstörung bestimmter Gehirnbereiche berichtet, während andere genauso gravierende Eingriffe die Rhythmik unbeeinflußt ließen (Fleissner, 1982; Roberts, 1966; Tyshchenko, 1973; Brady, 1971).

Es besteht also kein Zweifel, daß es Gehirnbereiche gibt, die absolut notwendig zum Aufrechterhalten einer Rhythmik sind, oder sogar Pacemakerregionen, die eine Population von zellulären Oszillatoren durch Hormone (Rensing, 1969, 1971; Brady, 1974) oder durch Neurone (Eskin, 1979; Takahashi und Menaker, 1979) synchronisieren. Das wären die Pars intercerebralis (Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1967; Cymborowski, 1973) und die Lobula (Sokolove, 1975; Roberts, 1974; Page, 1978) vieler Insekten.
Solche Zentren mag es auch bei DROSOPHILA und MUSCA geben. Unterschiede zwischen verschiedenen Arten könnten in der Stärke der Zentren bestehen und in der Fähigkeit anderer Zellen, die zerstörten Zentren zu ersetzen und deren Funktion zu übernehmen.

Bei Schaben kann die Lobula nicht von anderen Teilen des gesamten Oszillatorsystems ersetzt werden, und deshalb verschwindet die Rhythmik auf Dauer, wenigstens unter Freilaufbedingungen. Aber selbst bei Schaben und Grillen scheint eine stark gedämpfte Schwingung die Lobektomie zu überleben:
Die Singrhythmik von Grillen kann durch Temperaturzyklen synchronisiert werden, jedoch nur mit Zeitgeberperioden, die im Mitnahmebereich liegen (Rence und Loher, 1975).
Ähnliches wurde bei lobektomierten Schaben beobachtet (Lukat und Weber, 1979). Zwar wurden sie auch durch Temperaturzyklen außerhalb ihres Mitnahmebereichs synchronisiert, aber Page (unveröffentlicht) konnte zeigen, daß der Aktivitätsbeginn von der Periode des Zeitgebers abhängt.
Beides kann nur schwer als eine exogen gesteuerte Reaktion auf Licht angesehen werden.

Die Lobula scheint demnach zwar eine übergeordnete Rolle zu spielen, aber sie ist vielleicht nicht das einzige rhythmische Zentrum im System der Schaben. Mit Sicherheit ist sie nicht das einzige rhythmische Gebiet. So ist z.B. die Cuticularhythmik der Schaben völlig autonom, d.h. unabhängig von zentraler Steuerung. Sie bleibt in lobektomierten Schaben erhalten (Lukat, 1978) und funktioniert auch noch in isolierten Beinstücken in vitro (Weber, 1985 a, b).

Weitere Rhythmen wurden in zahlreichen isolierten Geweben nachgewiesen: Im Auge von APLYSIA (Eskin, 1971), in Kulturen von Rattenleberzellen (Hardeland 1973, Rensing et al. 1974) und -Darmepithelzellen (Sugiyama und Yasumoto, 1981), bei Darmstücken von MESOCRICETUS AURATUS (Bünning, 1958) und bei Speicheldrüsen von DROSOPHILA (Rensing, 1969; Nagel und Rensing, 1974; Weitzel und Rensing, 1981), um nur wenige zu nennen.

Alle diese Ergebnisse zeigen, daß viele Zellen eines Vielzellers zu autonomen circadianen Rhythmen befähigt sind.

Selbst bei Säugern, deren SCN nachgewiesenermaßen zentrale Pacemaker enthält, werden in letzter Zeit mehr und mehr zelluläre Rhythmen gefunden, die nach Zerstörung des SCN ungestört weiterlaufen (Albers et al., 1983; Moore-Ede, 1983).

Inwieweit Zellen in den optischen Ganglien Oszillatoren enthalten, kann nach den hier gemachten Versuchen nicht gesagt werden.

Es sollte lediglich deutlich gemacht werden, daß es eventuell keine eng umgrenzten Bereiche gibt, die ganz allein Pacemaker enthalten und nach deren Ausschalten die Rhythmik unwiederbringlich verschwindet. Möglicherweise tragen viele Zellen ihren Teil zur Rhythmik bei.

E.2. Möglicher Aufbau des Oszillatorsystems

Verschiedene Modelle wurden aufgestellt, bei denen Populationen von Oszillatoren die circadiane Rhythmik kontrollieren. Diese Modelle gehen gewöhnlicherweise von einer Gruppe von Oszillatoren mit circadianen Periodenlängen aus, die miteinander gekoppelt sind und deren Periodenlängen um eine Mittelwert von 24 Std. schwanken (Christensen und Lewis, 1982; Pavlidis, 1969, 1971).

Nach Christensen und Lewis gibt es eine "innere Gruppe" von Oszillatoren, die die Rhythmik steuern. Oszillatoren mit extrem abweichenden Periodenlängen bilden sogenannte "splinter-Gruppen", die normalerweise nicht signifikant zur ausgeübten Rhythmik beitragen, aber spontan mit der Zentralgruppe agieren. Sie können bei Störun-

gen irgendwelcher Art (exogene und endogene Störungen) mehr Gewicht bekommen und so Einfluß auf die Periodenlänge haben. Auch die Zusammensetzung der inneren Gruppe ist nicht starr, sondern ändert sich je nach äußeren Bedingungen. So kann man die unterschiedlichen Periodenlängen in verschiedenen Lichtbedingungen erklären.

Geht man davon aus, daß das gesamte Gehirn als Zellpopulation die Laufaktivitätsrhythmik von DROSOPHILA und MUSCA kontrolliert, so erscheint es plausibel, daß sich Aktivitätsmuster und Periodenlänge nach Verlust oder Abtrennung von Teilen des Gehirns ändern, selbst wenn diese Teile keine übergeordneten Oszillatoren enthalten.

Bei DROSOPHILA, MUSCA und CALLIPHORA herrscht eine gewisse Hierarchie unter den Einzeloszillatoren. Das häufige Auftreten von genau zwei Komponenten läßt vermuten, daß es zwei übergeordnete Gruppen gibt:
Eine Oszillatorpopulation, die eine mittlere Periodenlänge von ~25 Std. hat und bei DROSOPHILA und MUSCA im Freilauf meistens dominiert, und eine zweite Oszillatorpopulation mit einer mittleren Periodenlänge von ~22 Std, die bei CALLIPHORA dominiert.

Die Natur dieser beiden Populationen ist jedoch noch völlig unklar.

Zwei Komponenten in der Rhythmik wurden auch bei anderen Tierarten beobachtet.
Parallelen zu den hier beschriebenen Ergebnissen finden sich vor allem bei der Flugaktivität von CULISETA INCIDENS (Clopton, 1984) und der Laufaktivität von CALLIPHORA STYGIA (Waddel, 1984).

Ein weiterer Hinweis für eine Kontrolle auf der Basis von zwei Komponenten kann Splitting in zwei Komponenten sein.

Splitting wurde meist bei Vertebraten beobachtet (Pittendrigh, 1960; Hoffmann, 1971; Pohl, 1972; Gwinner, 1974; Pittendrigh und Daan, 1976b; Underwood, 1977; 1981; Earnest und Turek, 1982).
Unter bestimmten Bedingungen tritt es jedoch auch bei Insekten auf: So in der Laufaktivitätsrhythmik von LEUCOPHAEA MADERAE (Wie-

denmann, 1977) und HEMIDEINA THORACICA (Christensen und Lewis, 1982), im Singrhythmus von TELEOGRYLLUS COMMODUS (Wiedenmann, 1983; 1985; Wiedenmann und Loher, 1984) und in der ERG-Rhythmik von BLAPS GIGAS (Koehler und Fleissner, 1978).

Bei Insekten konnten die beiden Komponenten in vielen Fällen auf die bilaterale Organisation des Gehirns zurückgeführt werden (Wiedenmann, 1983; Koehler und Fleissner, 1978).

Im Falle von DROSOPHILA, MUSCA und CALLIPHORA ist dies unwahrscheinlich, da die Periodenlängen beider Komponenten sehr unterschiedlich sind und (mit Ausnahme der unilateralen Trennung des optischen Traktes bei MUSCA) keine Manipulationen unternommen wurden, die nur eine Gehirnhälfte betrafen.

Wiedenmann (1983) erklärte die beiden gefundenen Komponenten bei Grillen mit Licht- und Dunkelpacemakern in den optischen Ganglien. Beide sind normalerweise gekoppelt. Im Licht dominiert die Lichtkomponente mit einer Periodenlänge von ca. 25 Std. und im Dunkeln die Dunkelkomponente mit τ = 22,8 Std. Beide Komponenten sind in den optischen Ganglien lokalisiert. Unterbindet man im LL die Lichtzufuhr zu einem optischen Lobus, indem man die Retina entfernt, so wird in ihm die DD-Komponente ausgeprägt. Im intakten Lobus bleibt die LL-Komponente dominierend. Folglich prägen sich beide Rhythmen gleichzeitig aus.
Diese Erklärung kann für DROSOPHILA und MUSCA nicht stimmen, da auch im RR zwei Komponenten auftreten und die optischen Ganglien entweder fehlen oder abgetrennt sind. Übereinstimmungen bestehen jedoch in den beobachteten Periodenlängen.

Für Vertebraten wurde das "morning"- und "evening"-Oszillator-Modell (Pittendrigh, 1974; Pittendrigh und Daan, 1976 b) entworfen. Beide Oszillatoren verhalten sich wie bei Wiedenmanns Modell unter verschiedenen Lichtbedingungen unterschiedlich. Außerdem kann man mit ihnen das biphasische Verhalten der Tiere im LD erklären. Auf Übereinstimmungen mit MUSCA und DROSOPHILA wurde bereits im Kapitel C.3.1.3. eingegangen.

Beide Modelle können Teile der hier beobachteten Phänomene erklären, keines ist jedoch voll kompatibel. Die Herkunft der beiden Komponenten bei MUSCA, DROSOPHILA und CALLIPHORA bleibt damit spekulativ und kann nur durch weitere Versuche geklärt werden.

E.3. Extraoculare Fotorezeptoren bei MUSCA und DROSOPHILA

Komplexaugen und Ocellen sind bei beiden Arten nicht notwendig zur Synchronisation auf einen LD. Dies impliziert extraoculare Fotorezeptoren.
Die Komplexaugen könnten jedoch an der Synchronisation beteiligt sein. So scheinen sie besonders bei MUSCA für die Aktivität nach L-an verantwortlich zu sein. Folgende Gründe sprechen allerdings gegen eine Beteiligung der Komplexaugen an der Synchronisation:

1) Bei sehr niedrigen Lichtintensitäten verschwindet bei MUSCA die Aktivität nach L-an, obwohl die Komplexaugen intakt sind. Die blinden Doppelmutanten zeigen die L-an Komponente bei hohen Lichtintensitäten, obwohl die Komplexaugen fehlen. Diese Funde sprechen eher für eine Lichtintensitätsabhängigkeit der L-an Komponente.

2) Obwohl manchmal oculare Fotorezeptoren nachgewiesenermaßen nicht wichtig für die Mitnahme sind, können sie Maskiereffekte hervorrufen: Bei PROCAMBARUS CLARKII verschwindet die Laufaktivitätsrhythmik unmittelbar nach L-an nach Entfernung von Retina und Lamina (Page und Larimer, 1972). Bei HYALOPHORA CECROPIA verschwindet die kurze Flugaktivitätsphase bei L-an (Truman, 1974). Bei der Schlüpfrhythmik der gleichen Art fehlt nach Durchtrennung der optischen Trakte ebenfalls der Gipfel direkt nach L-an.

3) Extraretinale Fotorezeptoren zeichnen sich durch eine Unempfindlichkeit im langwelligen Bereich des Lichtes aus (ab 550 nm). Sehr empfindlich sind sie dagegen im Blaulichtbereich (Maximum um 450 nm) (Truman, 1976; Frank und Zimmermann, 1969; Klemm und Ninnemann, 1976). Vorläufige Versuche bei MUSCA Phasenverschiebungen durch farbiges Licht zu verusachen, ergaben, daß durch Gelb-Rotlicht-Pulse keine Phasenverschiebungen zu erzielen waren, wohingegen Blaulicht und Weißlicht vergleichbar starke Phasenver-

schiebungen bewirkten. Bei DROSOPHILA stehen solche Versuche noch aus. Hier ließen sich blinde Fliegen nicht durch einen RD (12:12) synchronisieren (Mack, 1980). Die spektrale Empfindlichkeit ist bei beiden Arten also in Übereinstimmung mit der von extraocularen Fotorezeptoren.

Nach diesen Überlegungen sind extraoculare Fotorezeptoren allein verantwortlich für die Synchronisation der Fliegen.

Noch völlig unklar ist die Beschaffenheit und Lage der extraocularen Fotorezeptoren. Durch Abdeckungsexperimente konnten sie auf das Zentralgehirn eingegrenzt werden (Page, 1982 b); mit Ausnahme von MEGOURA VICIAE wurde jedoch noch kein extraocularer Fotorezeptor sicher identifiziert. Bei MEGOURA konnte die Lichtrezeption mit Hilfe feiner Lichtleiter auf die Pars intercerebralis eingeengt werden (Lees, 1964; Steel und Lees, 1977). In Hinblick auf DROSOPHILA ist dies insofern interessant, als die Aktivität der neurosekretorischen Zellen im LD zeitlich mit dem Aktivitätsmuster der Doppelmutanten übereinstimmt (Rensing, 1966 a).

F. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird das circadiane System der Dipteren DROSOPHILA MELANOGASTER, MUSCA DOMESTICA und CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA näher analysiert.

Im Schwerpunkt befaßt sich die Arbeit mit der Bedeutung der optischen Ganglien für die Laufaktivitätsrhythmik von D. MELANOGASTER und M. DOMESTICA und für die Schlüpfrhythmik von D. MELANOGASTER. Außerdem wird die Beteiligung der Komplexaugen an der Synchronisation der Laufaktivitätsrhythmik beider Dipteren näher untersucht.

Am Rande wird das neurosekretorische System von D. MELANOGASTER und ihren augenlosen Mutanten **sine oculis** und **small optic lobes; sine oculis** bzw. **minibrain;sine oculis** betrachtet und auf dessen mögliche Bedeutung für die Laufaktivitätsrhythmik eingegangen.

1. Das circadiane System der Dipteren D. MELANOGASTER, M. DOMESTICA und C. ERYTHROCEPHALA, das die Laufaktivitätsrhythmik kontrolliert, ist aus zwei Oszillatorpopulationen aufgebaut, die miteinander gekoppelt sind:

   - Neben Tieren mit deutlicher Rhythmik und arrhythmischen Tieren treten bei den drei Dipterenarten solche auf, die mehrere rhythmische Komponenten gleichzeitig zeigen: Bei D. MELANOGASTER sind es 14 %, bei M. DOMESTICA 15 % und bei C. ERYTHROCEPHALA 64 %.

   - Von diesen Fliegen hat ein großer Teil zwei Komponenten; eine mit einer Periodenlänge von ca. 22 Std. und eine zweite mit ca. 25 Std Periodenlänge.

   - Spontanes Entkoppeln beider Komponenten kommt in sehr schwachem LD und im Dauerlicht (LL) vor.

   - Im LL entkoppeln auch die Einzeloszillatoren beider Oszillatorpopulationen: Die Rhythmik von M. DOMESTICA wird mit steigender Lichtintensität zunehmend undeutlicher. Bei 0,5 lux haben 50 % der Fliegen mehrere Komponenten, bei 1,8 lux sind 81 % arrhythmisch.

2. Die optischen Ganglien enthalten bei D. MELANOGASTER und M. DOMESTICA keine entscheidenden Pacemaker für die Laufaktivitätsrhythmik. Sie beeinflussen jedoch die Kopplung zwischen beiden Oszillatorpopulationen und zwischen Einzeloszillatoren:

   - Der Anteil arrhythmischer Fliegen ist bei den D. MELANOGASTER-Gehirnmutanten **optomotor blind**, **lobula plateless**, **minibrain**, **small optic lobes**, **sine oculis** und den Doppelmutanten **small optic lobes;sine oculis** und **minibrain;sine oculis** mit verkleinerten optischen Ganglien ähnlich wie beim Wildtyp.

   - Mit zunehmender Verkleinerung der optischen Ganglien wird die Periode der Laufaktivitätsrhythmik länger und es treten signifikant häufiger Fliegen auf, die mehrere Komponenten gleichzeitig zeigen.

   - Bei M. DOMESTICA bleibt die Laufaktivitätsrhythmik nach Durchtrennung beider optischer Trakte und nach weitgehender Entfernung der optischen Ganglien bei 50 % der Fliegen erhalten. Ca. 25 % zeigen nach der Operation mehrere Komponenten gleichzeitig und 25 % sind arrhythmisch.

   - Die Arrhythmie konnte in der meisten Fällen auf Degenerationen im Zentralgehirn zurückgeführt werden.

   - Die postoperativen Rhythmen zeichnen sich durch eine leicht verlängerte Periode und eine signifikante Verlängerung der Aktivitätszeit aus.

3. Schlüpf- und Laufaktivitätsrhythmik werden von verschiedenen Oszillatorsystemen gesteuert. Für die Schlüpfrhythmik haben die optischen Ganglien keinerlei Bedeutung:

   - Die Schlüpfrhythmik ist bei den Mutanten deutlich ausgeprägt und ihre Periode ist unabhängig von der Größe der optischen Ganglien.

4. M. DOMESTICA und D. MELANOGASTER besitzen einen extraocularen Fotorezeptor für die Laufaktivitätsrhythmik. Die Komplexaugen

erhöhen lediglich die Lichtmenge, die auf diesen extraocularen Fotorezeptor trifft. Stark von dieser zusätzlichen Lichtmenge abhängig ist die Aktivität direkt nach L-an.

- Die blinden DROSOPHILA-Mutanten und die Stubenfliegen mit durchtrennten optischen Trakten lassen sich von einem LD (12:12) synchronisieren. Eine Synchronisation durch Strahlungswärme des Lichts kann ausgeschlossen werden, da ein Temperaturwechsel (2°C Temperaturunterschied) einen wesentlich schwächeren Zeitgeber darstellt.

- Der Wildtyp von DROSOPHILA und die augenlose Mutante **sine oculis**, deren optische Ganglien auf ca. 20 % verkleinert sind, zeigen im LD (300 und 40 lux) ein bimodales Aktivitätsmuster. Die Doppelmutante **small optic lobes;sine oculis**, deren optische Ganglien auf 5 % verkleinert sind, zeigt nur bei 300 lux Bimodalität. Bei 40 lux verschwindet die L-an Komponente, die L-aus Komponente bleibt.

- M. DOMESTICA zeigt im LD meist ein unimodales Aktivitätsmuster: Die Aktivität beginnt unmittelbar mit L-an und endet schlagartig mit L-aus. Fliegen mit durchtrennten optischen Trakten beginnen erst ca. 6 Std. nach L-an aktiv zu werden und sind noch in der Dunkelperiode aktiv. Fliegen mit abgedeckten Komplexaugen oder normale Fliegen bei sehr niedrigen Lichtintensitäten (3×10^{-4} lux) zeigen ein ähnliches Verhalten.

5. Die Arrhythmie der D. MELANOGASTER-Mutante per^0 kann durch ein asynchrones Schwingen vieler Einzeloszillatoren erklärt werden:

   - per^0 läßt sich durch einen LD synchronisieren und bleibt nach Ende desselben noch für einige Tage rhythmisch.

6. Das neurosekretorische System der augenlosen Mutanten **sine oculis**, **small optic lobes;sine oculis** und **minibrain;sine oculis** unterscheidet sich nicht vom Wildtyp.

G. ANHANG

G.1. Zuchtmedium für DROSOPHILA

1 l Wasser
100 g Weizengrieß
100 g Zuckerrübensirup
15 g Sat Isabgol (als Agarersatz; Sapra et al., 1982)
8 g Hefeflocken

Als Fungizide werden hinzugefügt:

5,0 ml 4-Hydroxi-Benzoesäure-Methylester (Nipagin)
1,5 ml Propionsäure

G.2. Nähere Angaben zur histologischen Technik

G.2.1. Physiologische Kochsalzlösungen

Zur Präparation von DROSOPHILA-Gehirnen

7,5 g NaCl
0,1 g KCl
0,2 g $NaHCO_3$
0,2 g $CaCl_2$
10,0 g Glucose
} pro 1 destilliertes Wasser

der pH-Wert ergibt sich zu 7,2;

Case-Puffer für MUSCA-Gehirne

7,50 g NaCl
0,35 g KCl
0,14 g $NaHCO_3$
0,21 g $CaCl_2$
2,50 g Glucose
} pro 1 destilliertes Wasser

der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt;

zum Stabilisieren wurde Sorensen-Puffer (19 ml KH_2PO_4 + 31 ml Na_2HPO_4) zugegeben.

G.2.2. Fixative

Bouin'sches Fixativ

75 ml gesättigte Lösung von Pikrinsäure (in Aqua dest.)
22 ml Formaldehyd
 5 ml Eisessig

Carnoy-Fixativ

12 ml Ethanol absolut
 6 ml Chloroform
 2 ml Eisessig

G.2.3. Farbstoffe

Herstellung von Paraldehydfuchsinlösung

1 g Basic Fuchsin (Allied Chemical Co.C.I. 42500) wird in 200 ml kochendem Wasser gelöst, die Lösung filtriert und
2 ml Eisessig und
2 ml Paraldehyd dazugegeben;

Alles wird für drei bis vier Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt, dann filtriert und das Sediment bei 50°C getrocknet, bis es auskristallisiert.

125 mg Paraldehydfuchsinkristalle werden in
50 ml 70 % Ethanol gelöst und
1 ml Eisessig dazugegeben.

Der pH-Wert der fertigen Färbelösung liegt bei ~ 2,5

Chicago-Blue

2 % Lösung von Chicago-Blue in Case-Puffer.

G.2.4. Schritte von Fixierung bis Einbettung

Bei DROSOPHILA-Gehirnen

Bouin'sches Fixativ:	3 Std.
gesättigte Lösung von Li_2CO_3 in 70 % Ethanol:	3 x 10 Min.
50 % Ethanol:	10 Min.
30 % Ethanol:	10 Min.
aqua dest.:	10 Min.
0,6 % H_2SO_4 / 0,6 % $KMnO_4$ 1 : 1	8 Min.
4,0 % $Na_2S_2O_4$:	30 Sek.
aqua dest.:	2 x 10 Min.
30 % Ethanol:	10 Min.
50 % Ethanol:	10 Min.
70 % Ethanol:	10 Min.
Paraldehydfuchsin:	30 Min.
70 % Ethanol:	2-3 Min.
90 % Ethanol:	10 Min.
95 % Ethanol:	10 Min.
100 % Ethanol:	5 Min.
Zedernöl:	über Nacht
Xylol:	10 Min.

Eindeckeln in DePeX

Bei Fliegenköpfen

Chicago-Blue:	10 Min.
Case-Puffer:	Auswaschen
Carnoy-Fixativ:	3 Std.
100 % Ethanol:	2 x 15 Min.
Isopropanol:	3 Std.
"	6 Std.
"	12 Std.
Isopropanol / Paraffin 1:1	24 Std. bei 60°C
Paraffin (SM 48°C):	1 Std. "
"	5 Std. "
Paraffin (SM 58°C):	24 Std. "

Einblocken in ungebrauchtem Paraffin (Paraplast, SM 58°C)

H. LITERATUR

Albers H.E., Lydic R., Gander P.H. und Moore-Ede M.C. (1984): Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian timing system of the Squirrel monkey. I. The generation of rhythmicity. Brain Res. 300, 275-284.

Aschoff J. (1979): Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. Z. Tierpsychol. 49, 225-249.

Aschoff J. und Saint-Paul U.V. (1982): Circadian rhythms in the blowfly, PHORMIA TERRAENOVAE: the period in constant light. Physiol. Entomol. 7 (4), 365-370.

Azaryan A.G. und Tyshchenko V.P. (1970): Neural regulation of the circadian rhythm of motor activity in the house cricket, GRYLLUS DOMESTICUS L. (Orthoptera, Gryllidae). Entomol. Review 49, 38-45.

Balkenohl M. und Weber F. (1981): Sind auch bei holometabolen Insekten circadiane Schrittmacher der Aktivität in den optischen Ganglien lokalisiert? Mitt. dtsch. Ges. allg. angew. Entomol. 3, 223-227.

Bargiello T.A., Jackson F.R. und Young M.W. (1984): Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in DROSOPHILA. Nature 312, 752-754.

Bargiello T.A. und Young M.W. (1984): Molecular genetics of a biological clock in DROSOPHILA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2142-2146.

Block G.D. und Wallace S.F. (1982): Localization of a circadian pacemaker in the eye of a mollusc, BULLA. Science 217, 155-157.

Brady J. (1967 a): Control of the circadian rhythm of activity in the cockroach. I. The role of the corpora cardiaca, brain and stress. J. Exp. Biol. 47, 153-163.

Brady J. (1967 b): Control of the circadian rhythm of activity in the cockroach. II. The role of the sub-oesophageal ganglion and ventral nerve cord. J. Exp. Biol. 47, 165-178.

Brady J. (1971): The search for an insect clock. In: Biochronometry; ed: M. Menaker; Nat. Acad. Sci. 1971, Washington, pp. 505-515.

Brady J. (1974): The physiology of insect circadian rhythms. Adv. Insect Physiol. 10, 1-115.

Bünning E. (1958): Das Weiterlaufen der "physiologischen Uhr" im Säugerdarm ohne zentrale Steuerung. Naturwiss. 45, 68.

Bünning E. und Joerrens G. (1962): Versuche über den Zeitmeßvorgang bei der photoperiodischen Diapauseinduktion von PIERRIS BRASSICAE. Z. Naturforsch. 17 b, 57-61.

Chiba Y. und Kasai M. (1984): Circadian activity of mosquito deprived of optic lobe. Manuskript.

Christensen N.D. und Lewis R.D. (1982): The circadian locomotor rhythm of HEMIDEINA THORACICA (Orthoptera; Stenopelmatidae): the circadian clock as a population of interacting oscillators. Physiol. Entomol. 7, 1-13.

Christensen N.D. und Lewis R.D. (1983): The circadian locomotor rhythm of HEMIDEINA THORACICA (Orthoptera: Stenopelmatidae): a population of weakly coupled feedback oscillators as a model of the underlying pacemaker. Biol. Cybernet. 47 (3), 165-172.

Clopton J.R. (1984): Mosquito circadian and circa-bi-dian flight rhythms: a two-oscillator model. J. Comp. Physiol. A 155, 1-12.

Cymborowski B. (1973): Control of the circadian rhythm of locomotor activity in the house cricket. J. Insect Physiol. 19, 1423-1440.

Cymborowski B. (1981): Transplantation of circadian pacemaker in the house cricket, ACHETA DOMESTICUS L. J. Interdiscipl. Cycl. Res. 12 (2), 133-140.

Cymborowski B. (1983): Daily changes in synthesis and accumulation of neurosecretion in the brain of the house cricket. J. Interdiscipl. Cycl. Res. 14, 111-116.

Cymborowski B. und Brady J. (1972): Insect circadian rhythms transmitted by parabiosis - a re-examination. Nature New Biology 236 (68), 221-222.

Earnest D.J. und Turek F.W. (1982): Splitting of the circadian rhythm of activity in Hamsters: Effects of exposure to constant darkness and subsequent re-exposure to constant light. J. Comp. Physiol. 145, 405-411.

Engelmann W. und Honneger W. (1966): Tagesperiodische Schlüpfrhythmik einer augenlosen DROSOPHILA MELANOGASTER Mutante. Naturwiss. 53, 588.

Engelmann W. und Klemke W. (1983): Biologische Arbeitsbücher 34. Biorhythmen. Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg.

Engelmann W. und Mack J. (1978): Different oscillators control the circadian rhythm of eclosion und activity in DROSOPHILA. J. Comp. Physiol. 127, 229-237.

Enright J.T. (1980): The timing of sleep and wakefullness. Springer Verlag, Berlin.

Eskin A. (1971): Properties of the APLYSIA visual system: in vitro entrainment of the circadian rhythm of centrifugal regulation of the eye. Z. Vergl. Physiol. 74, 353-371.

Eskin A. (1979): Identification and physiology of circadian pacemakers. Fed. Proc. 38, 2570-2572.

Fischbach K.F. (1983): Neural cell types surviving congenital sensory deprivation in the optic lobes of DROSOPHILA MELANOGASTER. Dev. Biol. 95, 1-18.

Fischbach K.F. und Heisenberg M. (1981): Structural brain mutant of DROSOPHILA MELANOGASTER with reduced cell number in the medulla cortex and with normal optomotor yaw response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (2), 1105-1109.

Fleissner G. (1982): Isolation of an insect circadian clock. J. Comp. Physiol. 149, 311-316.

Fleissner G. (1983): Efferent neurosecretory fibres as pathways for circadian clock signals in the scorpion. Naturwiss. 70, 366-368.

Frank K.D. und Zimmerman W.F. (1969): Action spectra for phase shifts of a circadian rhythm in DROSOPHILA. Science 163, 688-689.

Gorf A. (1963): Der Einflu8 des sichtbaren Lichts auf die Neurosekretion der Sumpfdeckelschnecke VIVIPARA VIVIPARA L. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. 70, 266.

Gwinner E. (1974): Testosterone induces "splitting" of circadian locomotor activity rhythm in birds. Science 185, 72-74.

Handler A.M. und Konopka R.J. (1979): Transplantation of a circadian pacemaker in DROSOPHILA. Nature 279, 236-238.

Hardeland R. und Stange G. (1971): Einflüsse von Geschlecht und Alter auf die lokomotorische Aktivität von DROSOPHILA. J. Insect Physiol. 17, 427-434.

Hardeland R. (1973): Circadian rhythmicity in cultured liver cells. I. Rhythms in tyrosine aminotransferase activity and inducibility and in 3H-leucine incorporation. Int. J. Biochem. 4, 581-590.

Haskell P.T. und Moorhouse J.E. (1963): A blood borne factor influencing the activity of the central nervous system of the desert locust. Nature (Lond.) 197, 56-58.

Hastings J.W. (1959): Unicellular clocks. Ann. Rev. Microbiol. 13, 297-312.

Heidenreich D. (1982): Die Genetik der Mutante minibrain von DROSOPHILA MELANOGASTER. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

Heisenberg M., Wonneberger R. und Wolf R. (1978): Optomotor-blind - a DROSOPHILA mutant of the lobula plate giant neurons. J. Comp. Physiol. 124, 287-296.

Helfrich C. und Engelmann W. (1983): Circadian rhythm of the locomotor activity in DROSOPHILA MELANOGASTER mutants "sine oculis" and "small optic lobes". Physiol. Entomol. 8, 257-272.

Hoffmann K. (1971): Splitting of the circadian rhythm as a function of light intensity. In: Biochronometry, ed: M. Menaker; Nat. Acad. Sci., Washington, pp 134-151.

Huber F. (1965): Neural integration (central nervous system). In: The physiology of insecta. Vol. 2; ed: M. Rockstein; Academic Press, New York, pp 333-406.

Jacklet J.W. (1969): Circadian rhythm of optic nerve impulses recorded in darkness from isolated eye of APLYSIA. Science 164, 562-563.

Jacklet J.W. und Geronimo J. (1971): Circadian rhythm: population of interacting neurones. Science 174, 299-302.

Kalmus H. (1938): Die Lage des Aufnahmeorgans für die Schlüpfperiodik von DROSOPHILA. Z. Vergl. Physiol. 26, 362-365.

Kasai M. und Chiba Y. (1984): The mosquito clock is not in the optic lobes. 10th intern. Congress of Biometeorology, Tokyo.

Klemm E. und Ninnemann H. (1976): Detailed action spectrum for the delay shift in pupae emergence of DROSOPHILA PSEUDOOBSCURA. Photochem. Photobiol. 24, 369-371.

Klug N. (1958/59): Histophysiologische Untersuchungen über die Aktivitätsperiodik bei Carabiden. Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berl., math.-nat. Reihe 8, 405-434.

Koehler W.K. und Fleissner G. (1978): Internal desynchronisation of bilaterally organized circadian oscillators in the visual system of insects. Nature 274, 708-710.

Köpf H. (1957): Über Neurosekretion bei DROSOPHILA. I. Zur Topographie und Morphologie neurosekretorischer Zentren bei der Imago von DROSOPHILA. Biol. Zentralblatt 76, 28-42.

Konopka R.J. und Benzer S. (1971): Clock mutants of DROSOPHILA MELANOGASTER. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2112-2116.

Konopka R.J. und Wells S. (1980): Drosophila clock mutations affect the morphology of a brain neurosecretory cell group. J. Neurobiol. 11, 411-415.

Lees A.D. (1964): The location of the photoperiodic receptors in the aphid MEGOURA VICIAE Buckton. J. Exp. Biol. 41, 119-133.

Loher W. (1972): Circadian control of stridulation in the cricket, TELEOGRYLLUS COMMODUS. J. Comp. Physiol. 79, 173-190.

Lukat R. (1978): Circadian growth layers in the cuticle of behaviourally arrhythmic cockroaches (BLABERUS FUSCUS, Ins., Blattiodea). Experimentia 34, 477.

Lukat R. und Weber F. (1979): The structure of locomotor activity in bilobectomized cockroaches (BLABERUS FUSCUS). Separ. Experentia 35, 38. (Birkhäuser Verlag, Basel.)

Mack J. (1980): Das Multioszillatorsystem von DROSOPHILA. Doktor-Arbeit, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Martin W. (1978): The analysis of time series by the interactive computer program system Timesdia. Veröffentlichung des Regionalen Hochschulzentrums (RHRZ), Bonn.

Moore R.Y. und Eichler V.B. (1972): Loss of circadian adrenal corticosterine rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. Brain Res. 42, 201-206.

Moore-Ede M.C. (1983): The circadian timing system in mammals: Two pacemakers preside over many secondary oscillators. Fed. Proc. 42 (11), 2802-2808.

Nagel G. und Rensing L. (1974): Circadian rhythm in size and 3H-uridine incorporation of single puffs of DROSOPHILA salivary glands in vitro. Exp. Cell Res. 89, 436-439.

Nayar J.K. und Sauermann D.M.Jr. (1971): The effect of light regimes on the circadian rhythm of flight activity in the mosquito AEDES TAENIORHYNCHUS. J. Exp. Biol. 54 (3), 745-756.

Nishiitsutsuji-Uwo J., Petropulos S.F. und Pittendrigh C.S. (1967): Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. I. Role of the pars intercerebralis. Biol. Bull. 133, 679-696.

Nishiitsutsuji-Uwo J. und Pittendrigh C.S. (1968 a): Central nervous system control of circadian rhythmicity of the cockroach. II. The pathway of light signals that entrain the rhythm. Z. Vergl. Physiol. 58, 1-13.

Nishiitsutsuji-Uwo J. und Pittendrigh C.S. (1968 b): Central nervous system control of circadian rhythmicity of the cockroach. III. The optic lobes, locus of the driving oscillation? Z. Vergl. Physiol. 58, 14-46.

Özbas S. und Hodgson E.S. (1958): Action of insect neurosecretion upon central nervous system in vitro and upon behaviour. Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 825-830.

Page T.L. (1978): Interactions between bilaterally paired components of the cockroach circadian system. J. Comp. Physiol. 124, 225-236.

Page T.L. (1982 a): Transplantation of the cockroach circadian pacemaker. Science 216, 73-75.

Page T.L. (1982 b): Extraretinal photoreception in entrainment and photoperiodism in invertebrates. Experientia 38, 1007-1013.

Page T.L. (1983): Regeneration of the optic tracts and circadian pacemaker activity in the cockroach LEUCOPHAEA MADERAE. J. Comp. Physiol. 152, 231-240.

Page T.L., Caldarola P.C. und Pittendrigh C.S. (1977): Mutual entrainment of bilaterally distributed circadian pacemakers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (3), 1277-1281.

Page T.L. und Larimer J.L. (1972): Entainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. J. Comp. Physiol. 78, 107-120.

Parker A.H. (1962): Studies on the diurnal rhythms of the housefly, MUSCA DOMESTICA L., in a dry tropical environment. Acta Tropica 19 (2), 97-119.

Pavlidis T. (1969): Populations of interacting oscillators and circadian rhythms. J. Theor. Biol. 22, 418-436.

Pavlidis T. (1971): Populations of biochemical oscillators as circadian clocks. J. Theor. Biol. 33, 319-338.

Pittendrigh C.S. (1960): Circadian rhythms and the circadian organisation of living systems. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 25, 159-184.

Pittendrigh C.S. (1974): Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular systems. In: The Neurosciences: Third study program; eds: F.O. Schmitt und E.G. Worden; MIT Press, cambridge, Mass. pp 437-458.

Pittendrigh C.S. und Daan S. (1976 a): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. J. Comp. Physiol. 106, 223-252.

Pittendrigh C.S. und Daan S. (1976 a): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents IV. Entrainment: Pacemaker as clock. J. Comp. Physiol. 106, 291-331.

Pohl H. (1972): Die Aktivitätsperiodik von zweitagaktiven Nagern, FUNAMBULUS PALMARUM und EUTAMIAS SIBIRICUS unter Dauerlichtbedingungen. J. Comp. Physiol. 78, 60-74.

Raabe M. (1982): Insect Neurohormones. Plenum Press, New York.

Rence B. und Loher W. (1975): Arrhythmically singing crickets: thermoperiodic reentrainment after bilobectomy. Science 190, 385-387.

Rensing L. (1966 a): Zur circadianen Rhythmik des Hormonsystems von DROSOPHILA. Z. Zellforsch. 74, 559-595.

Rensing L. (1966 b): Zur circadianen Rhythmik des Sauerstoffverbrauchs von DROSOPHILA. Z. Vergl. Physiol. 53, 62-83.

Rensing L. (1969): Circadiane Rhythmik von DROSOPHILA Speicheldrüsen in vivo, in vitro und nach Ecdyson-Zugabe. J. Insect Physiol. 15, 2285-2303.

Rensing L. (1971): Hormonal control of circadian rhythms in DROSOPHILA. In: Biochronometry; ed.: Menaker; Natl. Acad. Sci., Washington, pp 527-540.

Rensing L., Brunken W. und Hardeland R. (1968): On the genetics of a circadian rhythm in DROSOPHILA. Experientia 24, 509-510.

Rensing L., Goedeke K., Wassmann G. und Brioch G. (1974): Presence and absence of daily rhythms of nuclear size and DNA synthesis of different, normal and transformed cells in culture. J. Interdiscipl. Cycl. Res. 5, 267-276.

Roberts S.K. (1966): Circadian activity rhythms in cockroaches. III. The role of endocrine and neural factors. J. Cell Physiol. 67, 473-486.

Roberts S.K. (1974): Circadian rhythms in cockroaches. Effects of optic lobe lesions. J. Comp. Physiol. 88, 21-30.

Roeder K.D. (1967): Nerve cells and insect behaviour. 2nd ed. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts.

Saint-Paul U.V. und Aschoff J. (1979): Circadian rhythms in the blowfly, PHORMIA TERRAINOVAE: range of entrainment and independence of period from age and intensity of illumination. Chronobiol. 6 (2), 150.

Sapra G.R., Kaul N. und Dass C.M.S. (1982): An inexpensive culture medium for the fruit fly DROSOPHILA MELANOGASTER. Indian J. Exp. Biol. 20, 193-194.

Scharrer B. (1952): Neurosecretion. XI. The effects of nerve section on the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insect, LEUCOPHAEA MADERAE. Biol. Bull. 102, 261-272.

Siegel S. (1956): Nonparametric statistics for the behavioural sciences. Mc Graw-Hill, New York, Toronto, London.

Smith R.F. und Konopka R.J. (1981): Circadian clock phenotypes of chromosome aberrations with a breakpoint at the per locus. Mol. Gen. Genet. 183, 243-251.

Smith R.F. und Konopka R.J. (1982): Effects of dosage alterations at the per locus on the period of the circadian clock of DROSOPHILA. Mol. Gen. Genet. 185, 30-36.

Sokolove P.G. (1975): Localization of the cockroach optic lobe circadian pacemaker with microlesions. Brain Res. 87, 13-21.

Sokolove P.G. und Loher W. (1975): Role of eyes, optic lobes and pars intercerebralis in locomotory and stridulatory circadian rhythms of TELEOGRYLLUS COMMODUS. J. Insect Physiol. 21, 785-799.

Steel C.G.H. und Lees A.D. (1977): The role of neurosecretion in the photoperiodic control of polymorphism in the aphid, MEGOURA VICIAE. J. Exp. Biol. 67, 117-135.

Stephan F.K. und Zucker I. (1972): Circadian rhythms in drinking behaviour and locomotory activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1583-1586.

Stetson M.H. und Watson-Whitmyre M. (1976): Nucleus suprachiasmaticus: the biological clock in the hamster? Science 191, 197-199.

Strausfeld N.J. (1976): Atlas of an insect brain. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Sugiyama K. und Yasumoto K. (1981): Daily rhythmic changes in amino acid transport in isolated intestinal epithelial cells from rats on restricted feeding regimen. Agric. Biol. Chem. 45 (1), 167-175.

Takahashi J.S. und Menaker M. (1979): Physiology of avian circadian pacemakers. Fed. Proc. 38, 2583-2588.

Thomsen M. (1965): The neurosecretory system of the adult CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA. II. Histology of the neurosecretory cells of the brain and some related structures. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 67, 693-717.

Tomioka K. und Chiba Y. (1982): Persistence of circadian ERG rhythm in the cricket with optic tract severed. Naturwiss. 69, 395-396.

Tomioka K. und Chiba Y. (1984): Effects of nymphal stage optic nerve severance or optic lobe removal on the circadian locomotor rhythm of the cricket, GRYLLUS BIMACULATUS. Zool. Science 1, 375-382.

Truman J.W. (1972): Circadian rhythms and physiology with reference to neuroendocrine processes in insects. Proceedings of the International Symposium on Circadian Rhythmicity, Wageningen, The Netherlands. April 1971, pp. 111-135.

Truman J.W. (1974): Physiology of insect rhythms. IV. Role of the brain in the regulation of the flight rhythm of the giant silkmoths. J. Comp. Physiol. 95, 281-296.

Truman J.W. (1976): Extraretinal photoreception in insects. Photochem. Photobiol. 23, 215-225.

Tsutsumi C. (1973): Characteristics of the daily behaviour and activity patterns of the adult housefly with special reference to time-keeping device. Japan J. Med. Sci. Biol. 26, 119-141.

Tyshchenko V.P. (1973): The role of the nervous cells in circadian rhythm regulation in insecta. In: Neurobiology of Invertebrates; ed: J. Salanki; Tihany, Hungary, pp 461-467.

Underwood H. (1977): Circadian organization in lizards: the role of the pineal organ. Science 195, 587-589.

Underwood H. (1981): Circadian organization in the lizard SCELEPORUS OCCIDENTALIS: the effects of pinealectomy, blinding and melatonin. J. Comp. Physiol. 141, 537-547.

Waddel B.C. (1984): Differential clock control of the circadian rhythms of eclosion and adult locomotor activity in CALLIPHORA STYGIA (Diptera: Calliphoridae). M. Sc. Thesis, Univ. of Auckland, New Zealand.

Weber F. (1985 a): Control and significance of the circadian growth of the endocuticle in cockroaches (BLABERUS CRANIIFER, Blattodea). In: Temporal Order; eds: L. Rensing und N.J. Jaeger, pp 248-249.

Weber F. (1985 b): Postmolt cuticle growth in a cockroach: in vitro deposition of multilamellate and circadian-like layered endocuticle. Experentia, in press.

Weitzel G. und Rensing L. (1981): Evidence for cellular circadian rhythms in isolated fluorescent dye-labelled salivary glands of wild-type and an arrhythmic mutant of DROSOPHILA MELANOGASTER. J. Comp. Physiol. 143, 229-235.

Wiedenmann G. (1977): Two activity peaks in the circadian rhythm of the cockroach LEUCOPHAEA MADERAE. J. Interdiscipl. Cycl. Res. 8 (3-4), 378-383.

Wiedenmann G. (1978): Eigenschaften von zwei Tagesrhythmen bei Schaben der Art LEUCOPHAEA MADERAE (Fabricius) und BLABERUS FUSCUS (Burmeister). Dissertation, Tübingen.

Wiedenmann G. (1980): Two peaks in the activity rhythm of cockroaches controlled by one circadian pacemaker. J. Comp. Physiol. 137, 249-254.

Wiedenmann G. (1983): Splitting in a circadian activity rhythm: the expression of bilaterally paired oscillators. J. Comp. Physiol. 150, 51-60.

Wiedenmann G. (1985): Weak coupling between the two pacemakers of the bilateral circadian mechanism in crickets. In: Temporal Order; eds: L. Rensing und N.J. Jaeger, pp 273-274.

Wiedenmann G. und Loher W. (1984): Circadian control of singing in crickets: Two different pacemakers for early-evening and before-dawn activity. J. Insect Physiol. 30 (2), 145-151.

Young M.W. und Judd B.H. (1978): Nonessential sequences, genes and the polytene chromosome bands of DROSOPHILA MELANOGASTER. Genetics 88, 723-742.

Zimmermann W.F. und Goldsmith T.H. (1971): Photosensitivity of visual receptors in carotenoid depleted DROSOPHILA. Science 171, 1167-1168.

Zimmermann W.F. und Ives D. (1971): Some photophysical aspects of circadian rhythmicity in DROSOPHILA. In Biochronometry; ed: M. Menaker; pp. 381-391. Natl. Acad. Aci., Washington.

Lebenslauf

30. 8. 1957	in Heilbronn-Sontheim geboren Vater: Richard Helfrich Mutter: Ilse Helfrich, geb. Bürgel
1964 - 1967	Breitwiesenschule in Gerlingen-Gehenbühl
1967 - 1969	Mädchen-Gymnasium in Stuttgart-Feuerbach
1969 - 1976	Albert-Schweitzer-Gymnasium in Leonberg
11. 5. 1976	Abitur
WS 1976/77	Beginn des Biologie-Diplom-Studiums an der Universität Stuttgart
SS 1977	Wechsel an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen
WS 1980/81	Diplom-Hauptfachprüfung Hauptfach: Pflanzenphysiologie Nebenfächer: Biochemie, Genetik, Zoologie zusätzl. Nebenfach: Mikrobiologie
1981 - 1982	Diplomarbeit am Institut für Biologie I bei Prof. Dr. W. Engelmann
1982 - 1985	Doktorarbeit am Institut für Biologie I bei Prof. Dr. W. Engelmann
seit 1. 10. 1981	wissenschaftliche Angestellte am Institut für Chemische Pflanzenphysiologie beim Projekt: Biologische Grundlagen der Ökologie Projektleiter: Prof. Dr. H. Metzner
1.5. - 7.7. 1984	Aufenthalt an der Universität Warschau zum Erlernen von Anfärbemethoden für neurosekretorische Zellen bei Insekten unter der Anleitung von Prof. Dr. B. Cymborowski

Meine akademischen Lehrer waren:

Agerer, Allenstein, Ammermann, Apfelbach, Anke, Bardele, Bentrup, Berthold, Braun, Bunke, Cymborowski, Dobat, Drumm, Engelmann, Engels, Erkert, Felle, Frank, Frey, Grell, Grunewald, Günzl, Habermalz, Hadeler, Hager, Hantke, Haselmann, Hedenström, Klee, Kull, Kulzer, Lange, Loeffler, Mayer, Meier-Brook, Mecke, Nakel, Netzel, Oberwinkler, Pfeiffer, Rähle, Rienitz, Sander, Schlote, Schwarz, Schwemmle, Seiler, Seitz, Seyffert, Sperlich, Stransky, Suhr, Tichy, Wasner, Weitzel, Wenk, Winkelmann, Wöhrmann, Wörz, Zähner.

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 0 61 51 / 21 3 53